

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DEBORAH CRISTINA PORTES

***Eucalyptus* spp.: MINIESTAQUIA E DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS**

CURITIBA

2017

DEBORAH CRISTINA PORTES

***Eucalyptus* spp.: MINIESTAQUIA E DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dra. Katia Christina Zuffellato-Ribas

Co-Orientador: Dr. Ivar Wendling

CURITIBA

2017

P849 Portes, Deborah Cristina

Eucalyptus spp. : miniestaquia e determinações bioquímicas /
Deborah Cristina Portes. Curitiba: 2017.
101 f.; il.

Orientadora: Katia Christina Zuffellato-Ribas
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Produção Vegetal.

1. Eucalipto - Cultivo. 2. Eucalipto – Espécies. 3. Clonagem.
4. Plantas – Propagação por estaquia. I. Zuffellato-Ribas, Katia
Christina. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Agrárias. Programa de Pós - Graduação em Agronomia – Produção
Vegetal. III. Título.

CDU 582.883.4



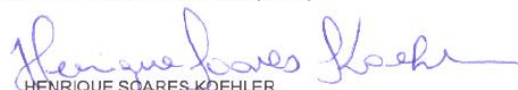
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

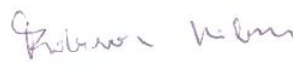
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **DEBORAH CRISTINA PORTES** intitulada: ***Eucalyptus* spp.: MINIASTAQUIA E DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 23 de Fevereiro de 2017.


KATIA CHRISTINA ZUFFELLATO-RIBAS
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


HENRIQUE SOARES KOEHLER
Avaliador Interno (UFPR)


CRISTIANE VIEIRA HELM
Avaliador Externo (EMBRAPA)


ROBERSON DIBAX
Avaliador Externo (UFFS)

DEDICO

*Aos meus pais que sempre apoiam os meus sonhos,
não medindo esforços para me ajudar a alcançá-los.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida, por todas as bênçãos recebidas e pela fé que tem me sustentado a cada dia para realização deste sonho.

Aos meus pais, irmãs e cunhado pelo grande apoio, amor, amizade e compreensão nas constantes ausências. Aos demais familiares que sempre me apoiaram, amo muito todos vocês!! À Nina, minha amada companheira.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade, aos professores pelo aprendizado e à Lucimara por todo o auxílio.

À minha querida orientadora Katia Christina Zuffellato-Ribas pela amizade, orientação, apoio e confiança no caminho da ciência, permitindo esta vitória.

À Embrapa Florestas por disponibilizar a estrutura, equipamentos e demais ferramentas utilizados durante esta pesquisa.

Aos profissionais da Embrapa Florestas pelo apoio e auxílio durante estes dois anos, em especial para o Ivar, Décio, Nide, Joel, Vero, Cristiane, Tiélidy, Fabrício, Dayanne, Daiane e Marcelo.

Aos amigos e companheiros da Embrapa Florestas, Fabiane, Tainise, Bruno, Simone, Bruna, Rozi, Tamires, Vivien e em especial para as melhores amigas e colegas que o mestrado me proporcionou: Francielen, Geisa e Aline. Obrigada a todos pelo apoio, auxílio, as risadas e almoços sempre divertidos para descontrair todos os acontecimentos desta longa caminhada.

Aos Zuffelletes Renata, Francielen, Francielli, Helena, Luciele, Leandro, Carlos e Rosimeri, pelo apoio e aprendizado do nosso GEPE.

As demais amigas, em especial a Isabella, Elizabeth, Maria Angélica e Heloisa, obrigada por aguentar e acompanhar esta minha vitória.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido.

Aos membros das bancas de pré-defesa e defesa pelas valiosas contribuições.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Muito obrigada!!

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”.

Anatole France

RESUMO

Pertencente à família Myrtaceae, o gênero *Eucalyptus* apresenta aproximadamente 730 espécies reconhecidas botanicamente. Dentre as espécies de interesse econômico, algumas possuem tolerância e/ou resistência à geadas: *E. camaldulensis* apresenta ampla utilização como matéria-prima na produção de lenha, carvão vegetal, serraria e óleos essenciais, e caracteriza-se por suportar inundações temporárias, temperaturas elevadas, longos períodos de seca e moderada resistência à geadas; *E. urograndis* é o híbrido mais amplamente utilizado para reflorestamento no Brasil, fonte de matéria-prima para a indústria de celulose e apresenta elevado crescimento em altura e diâmetro que garante seu melhor rendimento em madeira de alta qualidade, tolerando geadas leves; *E. benthamii* x *E. dunni* é indicado para plantio em áreas sujeitas a temperaturas mínimas de -6°C pois suporta 25 geadas anuais. A miniestquia é a técnica de propagação vegetativa mais empregada na produção de mudas clonais de eucalipto e adotada pela maioria dos produtores do setor florestal brasileiro. O objetivo do presente trabalho foi comparar o enraizamento de miniestacas de *E. camaldulensis*, *E. urograndis* e *E. benthamii* x *E. dunni* coletadas em quatro épocas, bem como a quantificação dos teores de ácido indol acético (IAA), proteínas e açúcares totais presentes nas miniestacas e sua correlação com o enraizamento. No segundo mês de cada estação foram confeccionadas 80 miniestacas por espécie, com 6 cm de comprimento e um par de folhas na porção apical com sua área reduzida à metade. As miniestacas foram plantadas em tubetes de 53 cm³ contendo substrato a base de vermiculita e casca de arroz carbonizado, mantidas em casa de vegetação durante 30 dias. Foram avaliadas as variáveis: porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes/miniestaca, presença de calos, sobrevivência e mortalidade das miniestacas, permanência do par de folhas e a indução de novas brotações. Os dados foram analisados num delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições de 20 miniestacas por unidade experimental em 4 tratamentos (estações do ano), onde as variâncias foram testadas quanto à homogeneidade pelo Teste Bartlett e as médias comparadas pelo Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson e testadas ao nível de 1% de significância. *E. camaldulensis* apresentou maior potencial rizogênico no verão, primavera e outono; *E. urograndis* no verão e outono, estações em que obtiveram também maiores teores de IAA. Miniestacas enraizadas e com calos foram observadas em grande porcentagem, portanto, *E. camaldulensis* e *E. urograndis* apresentam rizogênese indireta. *E. benthamii* x *E. dunni* obteve maior potencial rizogênico no outono, assim como IAA. Proteínas e açúcares totais mostraram-se característicos para as três espécies, observando-se maiores no outono e inverno. As análises de correlação mostraram uma correlação negativa significativa para açúcares totais em *E. camaldulensis* e *E. urograndis*, e quando analisadas as três espécies juntas observou-se correlação negativa significativa entre proteínas, açúcares totais e enraizamento.

Palavras-chave: Enraizamento, estações do ano, açúcares totais, proteínas, ácido indol acético.

ABSTRACT

The genus *Eucalyptus*, belonging to the family Myrtaceae, currently has more than 730 species recognized botanically. Among the species of economic interest, some have tolerance and / or resistance to frost: *E. camaldulensis* is widely used as a raw material for the production of firewood, charcoal, sawmills and essential oils, and is characterized by temporary floods, temperatures Long periods of drought and moderate resistance to frost; *E. urograndis* is the most widely used hybrid for reforestation in Brazil, a source of raw material for the pulp industry and has a high growth in height and diameter that guarantees its best yield in high quality wood, tolerating light frosts; *E. benthamii* x *E. dunni* is indicated for planting in areas subject to minimum temperatures of -6°C because it supports 25 annual frosts. Minicutting is the vegetative propagation technique most used in the production of clonal *eucalyptus* seedlings and adopted by most of the producers of the Brazilian forest sector. The objective of the present work was to compare the rooting of minicuttings of *E. camaldulensis*, *E. urograndis* and *E. benthamii* x *E. dunni* collected in four seasons, as well as the quantification of indole acetic acid (IAA), proteins and total sugars present in minicuttings and their correlation with rooting. In the second month of each season, 80 minicuttings were made per species, 6 cm in length and a pair of leaves in the apical portion with their area reduced by half. The minicuttings were planted in 53 cm³ tubes containing vermiculite-based substrate and charcoal rice husk, kept in a greenhouse for 30 days. The variables were evaluated: rooting percentage, number and length of roots/ minicutting, presence of calluses, survival and mortality of minicuttings, leaf pair permanence and induction of new shoots. The data were analyzed in a completely randomized design with 4 replicates of 20 minicuttings per experimental unit in 4 treatments (seasons), where the variances were tested for homogeneity by the Bartlett Test and the means compared by the Tukey Test at the 5% level of probability. Pearson correlation coefficients were calculated and tested at the 1% level of significance. *E. camaldulensis* presented higher rhizogenic potential in summer, spring and autumn; *E. urograndis* in summer and fall, seasons in which they also obtained higher levels of IAA. Rooted and callus minicutting were observed in a large percentage, therefore, *E. camaldulensis* and *E. urograndis* present indirect rhizogenesis. *E. benthamii* x *E. dunni* obtained higher rhizogenic potential in the fall, as well as IAA. Proteins and total sugars were characteristic for the three species, being observed larger in autumn and winter. The correlation analyzes showed a significant negative correlation for total sugars in *E. camaldulensis* and *E. urograndis*, and when analyzed the three species together showed a significant negative correlation between proteins, total sugars and rooting.

Key words: Rooting, seasons of the year, total sugars, proteins, indole acetic acid.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE APÊNDICES.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 <i>Eucalyptus</i> : CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA.....	20
2.1.1 <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.....	23
2.1.2 <i>Eucalyptus urophylla</i> S. T. Blake x <i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill.....	24
2.1.3 <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden & Cambage x <i>Eucalyptus dunni</i> Maiden.....	25
2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA.....	27
2.2.1 Miniestaquia.....	29
2.2.2 Fatores que influenciam no enraizamento.....	31
2.2.2.1 Época do ano.....	31
2.2.2.2 Ácido indol acético.....	33
2.2.2.3 Compostos bioquímicos.....	34
2.2.2.4 Outros fatores.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 MINIESTAQUIA.....	37
3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS MINIESTACAS.....	40
3.2.1 Preparo das amostras (secagem e trituração)	40
3.2.2 Determinação do teor de proteínas totais.....	41
3.2.3 Determinação do teor de açúcares totais.....	41
3.2.4 Quantificação de ácido indol acético.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	44
4.1.1 MINIESTAQUIA.....	44
4.1.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS MINIESTACAS.....	50
4.1.2.1 Teores de proteínas totais e açúcares totais.....	50
4.1.2.2 Teores de ácido indol acético (IAA).....	53
4.2 <i>Eucalyptus urograndis</i>	56

4.2.1	MINIESTAQUIA.....	56
4.2.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS MINIESTACAS.....	61
4.2.2.1	Teores de proteínas totais e açúcares totais.....	61
4.2.2.2	Teores de ácido indol acético (IAA).....	64
4.3	<i>Eucalyptus benthamii x Eucalyptus dunni</i>	66
4.3.1	MINIESTAQUIA.....	66
4.3.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS MINIESTACAS.....	71
4.3.2.1	Teores de proteínas totais e açúcares totais.....	71
4.3.2.2	Teores de ácido indol acético (IAA).....	72
5.	CONCLUSÃO	75
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICES	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Minicepas de <i>Eucalyptus</i> em sistema semi-hidropônico do tipo canaletão e suas brotações para confecção das miniestacas coletadas em quatro épocas, Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2016.....	38
FIGURA 2	Casa de vegetação com experimentos de enraizamento, Embrapa Florestas, Colombo –PR, 2016.....	39
FIGURA 3	Miniestaca de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> enraizada retirada do tubete e com substrato comercial (A), miniestaca enraizada e com a permanência do par de folhas iniciais (B), miniestaca enraizada, com calos e brotação (C), todas após período de 30 dias em casa de vegetação, Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2016.....	45
FIGURA 4	Porcentagem de enraizamento de miniestacas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , avaliadas nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	46
FIGURA 5	Porcentagem de miniestacas enraizadas, miniestacas com calos e miniestacas enraizadas e com calos de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	48
FIGURA 6	Teores de proteínas totais em base seca de miniestacas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> coletadas nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	51
FIGURA 7	Teores de açúcares totais em base seca de miniestacas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> coletadas nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	52
FIGURA 8	Cromatogramas: Corrente Total de Íons (TIC) (A); Fragmentos dos íons pais característicos: IAA (B) e padrão D7 (C); espectros	

	de massas dos íons pais após dissociação por colisão induzida de íons filho: IAA (D) e padrão D7 (E)	53
FIGURA 9	Porcentagem de enraizamento e teores de ácido indol acético (IAA) em miniestacas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	54
FIGURA 10	Miniestaca de <i>Eucalyptus urograndis</i> enraizada retirada do tubete e com substrato (A), miniestaca enraizada (B), miniestaca com calos e permanência do par de folhas iniciais (C), Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2016.....	57
FIGURA 11	Porcentagem de enraizamento das miniestacas de <i>Eucalyptus urograndis</i> avaliadas nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	58
FIGURA 12	Porcentagem de miniestacas enraizadas, miniestacas com calos e miniestacas enraizadas e com calos de <i>Eucalyptus urograndis</i> nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	60
FIGURA 13	Teores de proteínas totais em base seca de miniestacas de <i>Eucalyptus urograndis</i> nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	62
FIGURA 14	Teores de açúcares totais em base seca de miniestacas de <i>Eucalyptus urograndis</i> nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	63
FIGURA 15	Porcentagem de enraizamento e teores de ácido indol acético (IAA) em miniestacas de <i>Eucalyptus urograndis</i> nas quatro estações no ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	65
FIGURA 16	Miniestaca de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> enraizada e com calos (A), miniestacas com calos (B),	

	miniéstacas enraizadas com permanência do par de folhas iniciais (C), Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2016.....	67
FIGURA 17	Porcentagem de enraizamento das miniéstacas do <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> em duas épocas do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	68
FIGURA 18	Porcentagem de miniéstacas enraizadas, miniéstacas com calos e miniéstacas enraizadas e com calos de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> em duas estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	69
FIGURA 19	Teores de proteínas totais em base seca de miniéstacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> em duas estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	71
FIGURA 20	Teores de açúcares totais em miniéstacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> em duas estações do ano.....	72
FIGURA 21	Porcentagem de enraizamento e teores de ácido indol acético em miniéstacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> em duas épocas do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	73
FIGURA 22	Comparação de médias entre os clones de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , <i>Eucalyptus urograndis</i> , <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> das variáveis porcentagem de enraizamento (A), quantificação de IAA (B), teores de proteínas totais na base seca (C) e os teores de açúcares totais na base seca (D). Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2016.....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Espécies de <i>Eucalyptus</i> recomendadas para o plantio no Brasil.....	22
TABELA 2	Porcentagem de miniestacas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas, (MM), permanência do par de folhas (PF) e miniestacas brotadas (MB) a partir de material vegetal coletado em quatro épocas.....	47
TABELA 3	Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis enraizamento, proteínas, açúcares totais e IAA para <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	55
TABELA 4	Porcentagem de miniestacas de <i>Eucalyptus urograndis</i> enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas, (MM), permanência do par de folhas (PF) e miniestacas brotadas (MB) a partir de material vegetal coletado em quatro épocas.....	59
TABELA 5	Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis Enraizamento, Proteínas, Açúcares Totais e IAA para <i>Eucalyptus urograndis</i>	65
TABELA 6	Porcentagem de miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas, (MM), permanência do par de folhas (PF) e miniestacas brotadas (MB) a partir de material vegetal coletado em duas épocas.....	69
TABELA 7	Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis enraizamento, proteínas, açúcares totais e IAA para <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i>	73

TABELA 8	Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis enraizamento, proteínas, açúcares totais e IAA para <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , <i>Eucalyptus urograndis</i> e <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> avaliados em quatro estações do ano.....	74
----------	---	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1	Análise de variância para porcentagem de miniestacas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas (MM), permanência do par de folhas (PF), miniestacas brotadas (MB) e miniestacas enraizadas e com calos (MEC), coletadas no outono e primavera de 2015, verão e inverno de 2016, Embrapa Florestas, Colombo – PR.....	98
APÊNDICE 2	Análise de variância para os teores de proteínas totais (PT), açúcares totais (AT) e ácido indol acético (IAA) em miniestacas de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , coletadas no outono e primavera de 2015, verão e inverno de 2016, Embrapa Florestas, Colombo – PR.....	98
APÊNDICE 3	Análise de variância para porcentagem de miniestacas de <i>Eucalyptus urograndis</i> enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas (MM), permanência do par de folhas (PF), miniestacas brotadas (MB) e miniestacas enraizadas e com calos (MEC), coletadas no outono e primavera de 2015, verão e inverno de 2016, Embrapa Florestas, Colombo – PR.....	99
APÊNDICE 4	Análise de variância para os teores de proteínas totais (PT), açúcares totais (AT) e ácido indol acético (IAA) em miniestacas de <i>Eucalyptus urograndis</i> , coletadas no outono e primavera de 2015, verão e inverno de 2016, Embrapa Florestas, Colombo – PR.....	99
APÊNDICE 5	Análise de variância para porcentagem de miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas (MM), permanência do par de folhas (PF), miniestacas brotadas (MB) e miniestacas enraizadas e com calos (MEC),	

	coletadas no outono e primavera de 2015, Embrapa Florestas, Colombo – PR.....	100
APÊNDICE 6	Análise de variância para os teores de proteínas totais (PT), açúcares totais (AT) e ácido indol acético (IAA) em miniestacas de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunni</i> , coletadas no outono e primavera de 2015, Embrapa Florestas, Colombo – PR.....	100

1 INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae compreende cerca de 140 gêneros, dentre eles o *Eucalyptus*, natural da Austrália e adaptado a regiões que variam de sub-áridas a úmidas (HÉROULT *et al.*, 2013). *Eucalyptus* apresenta ampla utilização como matéria-prima na produção de papel, celulose, marcenaria, estruturas para construção civil, carvão vegetal, indústria química e farmacêutica (GONZÁLES, 2002). O setor privado tem demonstrado grande interesse no plantio de florestas de *Eucalyptus* para fixação de carbono, visando diminuir a concentração do dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera (ALFENAS *et al.*, 2004).

Buscando atender a demanda crescente de madeira, cujas características tecnológicas são exigidas para múltiplos usos, os plantios, principalmente com espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*, têm-se difundido e, por consequência, o número de mudas requeridas tem apresentado um aumento significativo (TORRES, 2003). Entre os fatores que limitam a produção de madeira de *Eucalyptus* em grande escala no país destaca-se a ocorrência de geadas e secas severas (HIGA *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2009; CARON *et al.*, 2011).

No Brasil estima-se que 751 mil km², ou seja, 8,8% da área total do país estão sujeitas a geadas e temperaturas baixas (SANTAROSA *et al.*, 2014). Em regiões com temperatura principalmente abaixo de 0° C, os danos ocasionados a cultura vão desde a queda de folhas, morte do ponteiro apical até a morte da planta (HIGA *et al.*, 2000; TIBBITS & HODGE, 2003; MORAES *et al.*, 2011). Atualmente, a importância do *Eucalyptus* na silvicultura clonal brasileira tem instigado investimentos significativos em pesquisa, proporcionando melhor o desenvolvimento da propagação vegetativa (TORRES, 2003).

Dentre as espécies de interesse econômico florestal, três que possuem tolerância e/ou resistência à geadas foram selecionadas para o presente estudo: *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus urograndis* e *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni*.

E. camaldulensis apresenta ampla utilização como matéria-prima na produção de lenha, carvão vegetal e óleo essencial. Caracteriza-se por suportar inundações temporárias, temperaturas elevadas, longos períodos de seca, solos pobres e

moderada resistência à geadas (NIETO & RODRIGUES, 2003; FERREIRA & SILVA, 2004; PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006). O híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* (*E. urograndis*) é amplamente utilizado para reflorestamento no Brasil, e fonte de matéria-prima para a indústria de celulose, apresentando elevado crescimento em altura e diâmetro, o que garante maior rendimento e qualidade da madeira, possui tolerância a geadas leves (FARIA *et al.*, 2013; SANTAROSA *et al.*, 2014). O híbrido de *E. benthamii* x *E. dunni* apresenta rápido crescimento e uniformidade dos talhões, é indicado para plantio em áreas sujeitas a temperaturas mínimas de -6°C, tolera até 25 geadas anuais (HIGA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2001; KJAER *et al.*, 2004; PALUDZYSZYN FILHO & SANTOS, 2011).

A propagação vegetativa consiste na multiplicação assexuada de partes de uma planta originando indivíduos idênticos à planta matriz. Este método conserva as características genéticas das plantas, sendo a estaquia e a miniestaquia as técnicas de fácil execução e de grande utilidade na área florestal (ZUFFELLATO-RIBAS & RODRIGUES, 2001; WENDLING, 2003; HARTMANN *et al.*, 2011). As principais vantagens da propagação em espécies florestais seriam os plantios clonais de alta produtividade, uniformidade e qualidade do produto final (WENDLING, 2003; BANDEIRA *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2009).

Uma das formas mais simples de propagação de espécies é a estaquia, que consiste em destacar uma parte da planta e plantá-la em substrato para que esta emita raízes e assim origine uma nova planta (MOTTA, 1995). É amplamente empregada e viável para praticamente todas as espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2001), porém resultados com miniestaquia têm apontado vantagens como melhor desempenho de enraizamento e do sistema radicial, bem como maior velocidade de emissão das raízes (SANTOS *et al.*, 2005). O interesse na introdução da miniestaquia para diversas espécies está relacionado à redução da área produtiva (adoção do minijardim clonal), diminuição do período de enraizamento e principalmente a redução ou isenção do uso de reguladores vegetais para indução do enraizamento (XAVIER *et al.*, 2003; WENDLING *et al.*, 2005).

Um dos fatores de grande influência na miniestaquia é a época do ano, de acordo com as variações ambientais e características de cada estação do ano podem ocorrer variações na produção de brotações das minicepas e no enraizamento das miniestacas (DIAS *et al.*, 2012). A estação do ano pode representar o fator decisivo

para o sucesso do enraizamento, portanto, temperaturas mais elevadas coincidem com o aumento da atividade das brotações, florescimento e crescimento (KIBBLER *et al.*, 2004).

As diferentes épocas do ano em que os propágulos são coletados apresentam efeito direto sobre o enraizamento, podendo ser relacionados ao nível endógeno de auxinas, compostos fenólicos, carboidratos e proteínas, que são importantes no decorrer do processo e que variam de acordo com a espécie (FERRIANI *et al.*, 2006). Os níveis de auxina variam de acordo com as estações do ano, ocorrendo em maiores concentrações durante a primavera e verão (VÁLIO, 1988). O efeito das folhas nas miniestacas se dá na continuidade da fotossíntese, ou seja, fornecendo carboidratos, hormônios e outras substâncias necessárias para o estímulo e crescimento de raízes adventícias (BIASI & COSTA, 2003).

Os órgãos em crescimento ativo apresentam maiores concentrações de auxinas endógenas, tais como regiões meristemáticas e folhas jovens (VÁLIO, 1988). Os tipos de estacas diferentes, do ponto de vista fisiológico, apresentam taxas de enraizamento variáveis. Desse modo, a quantidade de auxina exógena (ácido indol butírico, ácido naftalenoacético ou ácido 2,4 diclorofenoxiacético) necessária para induzir o enraizamento deve ser menor ou inexistente em estacas mais juvenis (NEVES *et al.*, 2006), assim como quantidades muito altas podem ser fitotóxicas e inibir o enraizamento.

O Brasil encontra-se entre os maiores produtores de madeira de *Eucalyptus*, sendo uma das principais culturas do agronegócio no país. Isto justifica a importância em obter informações sobre a adaptabilidade da cultura a novos ambientes, bem como viabilizar a redução do tempo na seleção de materiais superiores e, com isto, acrescentar mais rendimento à cultura.

Diante do interesse em ampliar as possibilidades de uso da espécie, a presente dissertação teve como objetivo principal realizar um estudo sobre enraizamento de três clones de *Eucalyptus* utilizando a técnica de miniestaquia, coletadas nas quatro estações do ano, visando selecionar a melhor época de coleta de propágulos vegetais, bem como a quantificação dos teores de ácido indol acético (IAA), proteínas e açúcares totais presentes nas miniestacas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Eucalyptus*: CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA

A família Myrtaceae compreende cerca de 140 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da Austrália, Ásia e América (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP III, 2009). O gênero *Eucalyptus* teve origem na Austrália e regiões próximas como Timor, Indonésia, Nova Guiné e sul das Filipinas (ELDRIDGE *et al.*, 1994). Historiadores mencionam que, por volta de 1774, o *Eucalyptus* foi introduzido na Europa e em 1788 foi descrito pela primeira vez pelo botânico francês L'Héritier de Brutelle, no Sertum Anglicum, em Paris (SILVA, 2001).

As florestas estão presentes em todo território nacional, sendo a Região Sudeste a que apresenta maior quantidade de áreas plantadas (53%), seguida pela Região Nordeste (15,8%), Centro-Oeste (13,4%), Sul (11,5%) e Norte (6,2%). A área de árvores plantadas para fins industriais no Brasil totalizou 7,74 milhões de hectares em 2014, aumento de 1,8% em relação a 2013. Segundo o último Relatório de Indústrias Brasileiras de Árvores, o plantio de *Eucalyptus* ocupa 5,56 milhões de hectares do País (IBÁ, 2015). Os Estados com maior concentração de plantios florestais são: Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Bahia e Mato Grosso do Sul (ABRAF, 2013; SANTAROSA *et al.*, 2014).

A partir da madeira de *Eucalyptus* são produzidos por ano 5,4 milhões de toneladas de celulose e 18,8 milhões de metros cúbicos de carvão vegetal, representando mais de 70,0% da produção nacional. Outro setor importante é o de chapa de fibra, com uma produção anual de 558 mil m³, representando 100% da produção nacional (SILVA, 2001). Em virtude de apresentar excelentes características silviculturais, adaptativas e de rápido crescimento (PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006; JAEGER & ZIGER, 2007) as espécies desse gênero são amplamente plantadas no Brasil em variadas condições de solo e clima (ROCHA & TRUGILHO, 2006; FOELKEL, 2007).

A celulose é a principal matéria-prima para a produção de papel, sendo assim têm-se dois tipos de madeira a de fibra curta e fibra longa. De forma geral, os papéis para escrever, de impressão e alguns tipos de papel cartão são fabricados a partir de fibras curtas, pois proporcionam maior opacidade e maciez. Já os papéis para embalagem e papelão ondulado são fabricados a partir de fibras longas, que propiciam maior resistência mecânica (IBÁ, 2015). O eucalipto possui madeira de fibras curtas, a qual destina-se à produtos menos rígidos, tendo assim maior demanda no mercado interno.

O grande interesse em plantar *Eucalyptus* decorre dos atributos inerentes a este gênero: rápido crescimento; tronco reto e grande em altura, permitindo aproveitamento máximo da madeira; apresenta bom desenvolvimento em solos de baixa fertilidade e, qualidade para uso como lenha e carvão. A alta produtividade de madeira (média nacional de 41 m³ ha⁻¹ ano⁻¹) com menores custos e maiores taxas de retorno do investimento, conferem grande atratividade ao cultivo do eucalipto (MOURA & GUIMARÃES, 2003; SANTAROSA *et al.*, 2014).

Eucalyptus é o gênero de maior utilização no reflorestamento nas diferentes regiões do Brasil, pois possibilita seu cultivo em diversos climas e tipos de solos, para os mais diversos fins, pois possui rápido crescimento, favorecendo a boa produtividade (CAMPINHOS JÚNIOR, 1987; TORRES, 2003; SILVEIRA, 2008). A produção de mudas, por propagação vegetativa tem como melhor técnica a estaquia, pois garante a maior viabilidade econômica para plantios clonais, permitindo a multiplicação de genótipos selecionados em menor custo e período de tempo (POGGIANI & SUITER FILHO, 1974; LANA *et al.*, 2008).

Plantios comerciais para uso de madeira são estabelecidos com mudas via propagação vegetativa, respeitando as dificuldades naturais das espécies quanto ao enraizamento. A opção de uso de material clonal requer maior cuidado devido a homogeneidade genética do material (PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006). A produção de mudas florestais, em qualidade e quantidade, é uma das fases mais importantes para o estabelecimento de bons povoamentos florestais (HOPPE *et al.*, 2004). Muitas pesquisas científicas e avanços tecnológicos tem sido realizados a fim de melhorar a qualidade das mudas, assegurando boa adaptação e crescimento após o plantio.

Tendo em vista essas características relacionadas ao valor econômico, as pesquisas com *Eucalyptus* vêm aumentando consideravelmente. Desta forma, novas técnicas podem contribuir para obtenção de características de interesse em menor espaço de tempo (GOLLE *et al.*, 2009). Em um diagnóstico recente realizado com cooperativas do Estado do Paraná, constatou-se que o déficit de energia de biomassa florestal é quase igual à produção atual em termos de área, indicando a necessidade de superar a área plantada (GOULART *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2012). Por isso, estima-se um aumento na demanda interna por eucalipto podendo contribuir para a expansão deste gênero no Brasil.

A grande demanda de madeira para diferentes finalidades (serraria, laminação, carvão e celulose) vem contribuindo para o desenvolvimento do setor florestal. O gênero *Eucalyptus* é conhecido por sua grande variabilidade genética, ou seja, centenas de espécies com propriedades físicas e químicas tão diferentes que fazem com que as diferentes espécies de eucalipto sejam usados para diversas finalidades (PEREIRA *et al.*, 2000; SANTAROSA *et al.*, 2014). WILCKEN *et al.* (2008) caracterizaram as principais espécies de *Eucalyptus* para o plantio no Brasil (Tabela 1), assim como suas diversas finalidades de uso.

Tabela 1: Espécies de *Eucalyptus* recomendadas para o plantio no Brasil.

Uso da madeira	Espécies
Papel e celulose	<i>E. grandis</i> , <i>E. globulus</i> , <i>E. urophylla</i> e Híbrido <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> (<i>E. urograndis</i>)
Chapas de fibra	<i>E. grandis</i> <i>E. urophylla</i> , <i>E. urograndis</i>
Móveis	<i>E. saligna</i> , <i>E. urophylla</i> , <i>E. grandis</i> , <i>E. dunnii</i> , <i>E. urograndis</i> , <i>E. pilularis</i>
Postes, dormentes, mourões	<i>C. citriodora</i> , <i>E. cloeziana</i> , <i>E. urophylla</i> , <i>E. camaldulensis</i> , <i>E. paniculata</i>
Carvão vegetal e lenha	<i>E. cloeziana</i> , <i>E. camaldulensis</i> , <i>E. urophylla</i> , <i>E. grandis</i> , <i>C. citriodora</i> , <i>E. tereticornis</i>
Estruturas (Construção Civil)	<i>C. citriodora</i> , <i>E. cloeziana</i> , <i>E. urophylla</i> , <i>E. paniculata</i> , <i>E. pilularis</i>
Óleo Essencial	<i>C. citriodora</i> , <i>E. staigeriana</i> , <i>E. camaldulensis</i> , <i>E. globulus</i>

O eucalipto, na fase de desenvolvimento inicial, é altamente sujeito a danos por baixas temperaturas e geadas de forte intensidade. Em regiões onde a incidência de geadas severas compromete o estabelecimento e a adaptação de espécies de *Eucalyptus*, a resistência ao frio é uma das características mais importantes que pode ser introduzida por meio da hibridação (ASSIS & MAFIA, 2007).

As regiões sul e sudeste do Brasil são o maior pólo consumidor e exportador da madeira oriunda de plantios florestais. No entanto, as espécies de *Eucalyptus* adaptadas às condições climáticas e economicamente importantes para a região constituem um grupo muito restrito, onde *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* são alternativas para o plantio, principalmente em função de sua tolerância e resistência a geadas (HIGA *et al.*, 2000; PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006).

A demanda para o desenvolvimento de híbridos para o gênero *Eucalyptus* está em constante desenvolvimento, visto que existem muitas espécies com características diferentes (PALUDZYSZYN FILHO & SANTOS, 2011). Segundo Assis & Mafia (2007) a hibridação pode proporcionar indivíduos resistentes às condições adversas ao meio ambiente e produzir indivíduos com facilidade na clonagem, já que praticamente todas as espécies tolerantes ao frio são recalcitrantes ao enraizamento.

2.1.1 *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh

Eucalyptus camaldulensis Dehnh ocorre praticamente em todos os Estados Australianos, e se destaca por ser uma espécie que ocorre predominantemente nas margens dos rios. Caracteriza-se por suportar inundações temporárias, temperaturas elevadas e períodos secos prolongados, solos pobres e moderada resistência à geadas, boa regeneração por meio de brotações de cepas e sensibilidade à competição radicular (FERREIRA, 1979; NIETO & RODRIGUEZ, 2003; FERREIRA & SILVA, 2004).

Esta espécie possui crescimento rápido, podendo chegar de 25 a 30 metros de altura, com folhas lanceoladas e alternadas. Sua casca se solta do tronco na forma de escamas, produzindo um eixo prateado acinzentado e marrom avermelhado, com madeira de cor avermelhada com densidade de mediana a elevada, podendo crescer

também em áreas compactadas por pastoreamento, não sendo uma característica ideal da espécie, com o desenvolvimento radicular limitado (FERREIRA, 1979; ODA *et al.*, 1986; NIETO & RODRIGUEZ, 2003; PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006).

A espécie apresenta grande variação de procedência em resposta à salinidade e à inundação (MARCAR *et al.*, 1995 citados por JOVANOVIĆ & BOOTH, 2002). Pesquisas realizadas em condições de clima tropical sub-úmido demonstram crescimento rápido de *E. camaldulensis* devido as características das raízes, profundas e ramificadas, promovendo a exploração do solo na direção vertical (GOMES, 1994; GONÇALVES & VALERI, 2001). Paludzyszyn Filho *et al.* (2006) relatam que esse crescimento acelerado das raízes pode ser responsável por uma má qualidade de reciclagem dos nutrientes acumulados nas folhas e ramos.

E. camaldulensis é uma das espécies adequadas para ser utilizada em áreas de reflorestamento. Sua madeira tem sido usada para diversos fins, como em construção, rolos de madeira, polpa de fibra curta, papel, madeira compensada e placas de aglomerado, devido sua densidade elevada. É utilizada também em marcenaria e carpintaria e para vigas transversais, postes de transmissão, carvão vegetal e pode ser plantada para proteger produções de mel (FERREIRA, 1979; NIETO & RODRIGUEZ, 2003). Na Itália, Israel e Marrocos o eucalipto é utilizado para celulose, já no Brasil estudos demonstram que esta espécie ainda não é muito aceita na produção de papel e celulose (FERREIRA & SILVA, 2004).

2.1.2 *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake x *Eucalyptus grandis* W. Hill

Eucalyptus urophylla S. T. Blake x *Eucalyptus grandis* W. Hill também chamado de *Eucalyptus urograndis* é amplamente utilizado no reflorestamento. Atualmente, mais de 600 mil hectares deste híbrido vem sendo cultivado no país nos Estados do Pará, Maranhão, Bahia, Espírito Santo e Rio Grande do Sul, assim como, na Venezuela, Colômbia, Congo, África do Sul e China, demonstrando ser uma das bases da silvicultura clonal (FARIA *et al.*, 2013; SANTAROSA *et al.*, 2014).

A maior área de plantio de *E. grandis* e seus híbridos está no Brasil e em outros países da América Central e do Sul. O clima da região de ocorrência natural dessa

espécie é, de modo geral, quente e úmido, variando entre temperatura média máxima de 24°C a 32°C; temperatura mínima do mês mais frio de 3°C a 17°C e precipitação média anual de 690 mm a 2.480 mm (BOLAND *et al.*, 1984; BOOTH *et al.*, 1988; JOVANOVIĆ & BOOTH, 2002). Para minimizar os danos por geadas, recomenda-se a execução do plantio mais cedo, antes do período de ocorrência de geadas, evitando baixadas e exposição sul de encostas, assim como a realização de cobertura do solo para reduzir danos por geadas.

A clonagem de *E. urograndis* tornou-se muito importante para o estabelecimento de plantios comerciais no Brasil, uma vez que possui resistência ao cancro causado por *Cryphonectria cubensis* (ZOBEL *et al.*, 1987 citados por SANTAROSA *et al.*, 2014; PALUDZYSZYN *et al.*, 2004). É característica do *E. grandis* o crescimento em altura e do *E. urophylla* crescimento em diâmetro, aumentando a densidade e rendimento da madeira e propriedades físicas da celulose. Assim, estas características juntas promovem melhorias no rendimento e uma madeira de boa qualidade (BRIGATTI *et al.*, 1980). Essa combinação interespecífica resulta em árvores vigorosas, além de serem amplamente utilizadas em plantios comerciais na produção de matéria-prima para celulose, carvão vegetal e madeira serrada (CARVALHO, 2000; PALUDZYSZYN *et al.*, 2004).

A clonagem do eucalipto resultou na grande contribuição da evolução tecnológica na silvicultura nacional, maior produtividade, qualidade desejada de madeira e alta estabilidade fenotípica na produção. Destaca-se *E. urograndis* como o mais recomendado para áreas tropicais, podendo sofrer danos com geadas leves, sendo a precipitação um dos fatores que mais influenciam sua produtividade (STAPE *et al.*, 1997; BRAGA, 2008).

2.1.3 *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden

Eucalyptus benthamii Maiden & Cabbage, espécie de ocorrência natural no oeste de Sydney - Austrália, é considerada vulnerável ao desaparecimento no seu local de origem (BUTCHER *et al.*, 2005). Segundo os mesmos autores, as sementes

de eucalipto apresentam baixa viabilidade, devido ao alto grau de autofecundação e endogamia.

A espécie é indicada para plantio nas regiões do Sul do Brasil e em altitudes entre 800 a 1.400 m, sujeitas a geada e temperaturas de até -6 °C, podendo ocorrer atrasos no desenvolvimento em altura das plantas (PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006). *E. benthamii* pode chegar de 30 a 45 metros, apresentando rápido crescimento e excelente capacidade adaptativa (KELLY, 1982; BENSON; McDOUGALL, 1998; KJAER *et al.*, 2004). Em relação a geadas, *E. benthamii* suporta até vinte e cinco geadas anuais, valor superior ao *Eucalyptus saligna*, o qual suporta apenas oito. Avaliações tecnológicas da madeira (densidade, poder calorífico e teor de lignina) demonstram que a espécie se enquadra na utilidade para fins energéticos (FAO, 1981; PALUDZYSZYN FILHO & SANTOS, 2011).

Eucalyptus dunnii Maiden apresenta bom comportamento em áreas mais frias (JOVANOVIĆ & BOOTH, 2002). Paludzyszyn Filho, Santos & Ferreira (2006) indicam o plantio da espécie em regiões com temperaturas mínimas de até -5°C, sob condições de aclimação prévia por gradual redução de temperatura na estação fria, suportando até vinte e duas geadas anuais. Higa *et al.* (2000) analisaram o comportamento de *E. dunnii* sob geada severa no ano de 1994 em Campo do Tenente - PR, com temperatura mínima registrada de -6,5°C, onde a geada não afetou a sobrevivência das progênies, apenas reduziu a altura na maioria das plantas.

Na região de Guarapuava - PR, Paludzyszyn Filho, Santos & Ferreira (2006) observaram plantios experimentais sob efeito da geada, onde foi registrado atraso no desenvolvimento de *E. dunnii* em relação a *E. benthamii*, com perda de produção em torno de 50 m³ ha⁻¹. Este fato evidencia que o *E. benthamii* não é tolerante, e sim resistente à geadas (SANTOS, AUER & GRIGOLETTI JUNIOR, 2001).

A madeira de *E. dunnii* apresenta características adequadas para a produção de celulose (FERREIRA *et al.*, 1997; JOVANOVIĆ *et al.*, 2000). Jaeger & Ziger (2007) observaram que painéis compensados constituídos de *E. dunnii* apresentam melhores resultados comparativamente àqueles fabricados com lâminas de *Pinus taeda* e ressaltam a viabilidade de uso para este fim.

No Brasil, uma das primeiras populações genéticas de *E. benthamii* foi introduzida pela Embrapa Florestas no ano de 1988, em Colombo - PR. Esse povoamento consta de famílias de procedência Wentworth Falls e Austrália, onde

apresentaram alta resistência à geadas, rápido crescimento, boa forma de fuste e alta homogeneidade do talhão (GRAÇA *et al.*, 1999).

O híbrido espontâneo entre *E. benthamii* x *E. dunni* vem sendo pesquisado desde 2006, despertando a atenção na região centro-oeste do Paraná pela elevada heterose para crescimento em comparação com as espécies parentais e prevalência da expressiva tolerância ao frio da espécie materna. Apresenta-se como uma alternativa em plantios florestais, principalmente em função da respectiva tolerância e resistência a geadas (PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006).

2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

A propagação vegetativa propicia manutenção de características desejáveis da planta matriz, bem como a produção de produtos padronizados. Apresenta-se como alternativa para reprodução de plantas que produzem poucas sementes, ou cujas sementes germinem com dificuldade (BITTENCOURT, 2006), além da produção de mudas uniformes, a qual permite rápida seleção e multiplicação de indivíduos adultos com características desejáveis, podendo refletir diretamente na qualidade e quantidade da madeira produzida (SILVA *et al.*, 2012).

A propagação vegetativa via estaca é muito utilizada em diversas culturas, e a formação de raízes adventícias na estaca depende da capacidade das células se desdiferenciarem e reiniciarem o processo de divisão celular, a fim de formar um novo ponto de crescimento meristemático (HARTMANN *et al.*, 2011). A estaca é viável para produção de novos indivíduos em curto período de tempo, multiplicação de genótipos selecionados e redução de custos. Consiste em destacar da planta original um segmento e colocá-lo em meio adequado para que se forme um sistema radicial e/ou desenvolva-se a parte aérea (PAIVA & GOMES, 1993). Este processo não inclui meiose, portanto, os ramos (brotações originárias da planta matriz) são geneticamente idênticos aos da planta matriz (HIGASHI *et al.*, 2000).

Diante disso, a propagação de espécies florestais por sementes resulta em mudas desuniformes e sujeitas à baixa qualidade em virtude da grande variação genotípica, o que pode ser prejudicial à produtividade dos plantios. Por outro lado, a

propagação vegetativa permite a fixação de genótipos selecionados, evitando a variabilidade genética, o que proporciona inúmeros benefícios ao setor florestal, principalmente pela formação de plantios clonais produtivos, aliado à melhoria da qualidade da madeira e derivados (BANDEIRA *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2009).

A técnica de clonagem, que originou o conceito de florestas clonais, foi desenvolvida a partir da estaquia (ASSIS, 1997) e o desenvolvimento desta técnica teve início na década de 90 para o gênero *Eucalyptus* (HIGASHI *et al.*, 2000; WENDLING, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2007). Os avanços da tecnologia de propagação vegetativa de *Eucalyptus* spp. decorrentes do atual desenvolvimento da silvicultura clonal, obtidos nos últimos anos, despertaram interesses à avaliação da eficiência das técnicas de produção de mudas, bem como ao desenvolvimento destas no campo (SANTOS *et al.*, 2005).

Embora a propagação vegetativa comercial de espécies florestais seja relativamente recente, vários métodos têm sido desenvolvidos desde seu início, principalmente para espécies do gênero *Eucalyptus*. Atualmente, os principais métodos usados em nível comercial são: estaquia e miniestaquia (WENDLING, 2003; FERRARI *et al.*, 2004).

Vários fatores podem influenciar o enraizamento das estacas, tanto intrínsecos, relacionados à própria planta, quanto extrínsecos, ligados às condições ambientais (RAMOS *et al.*, 2003). Entre os fatores intrínsecos destacam-se a condição fisiológica da planta matriz, constituição genética, idade da planta, tipo de estaca, época do ano, balanço hormonal, cofatores de enraizamento e inibidores do enraizamento (ZUFFELLATO-RIBAS & RODRIGUES, 2001; ALFENAS *et al.*, 2004; XAVIER *et al.*, 2009). A importância da seleção de matrizes, ausência de patógenos e susceptibilidade à doenças, permitiu que a propagação vegetativa se tornasse o principal método de reprodução clonal de árvores selecionadas (HAAG, 1983).

O estado fisiológico da planta assume importância fundamental no processo de enraizamento, este fato já é conhecido há muito tempo, onde a capacidade de enraizar em muitas espécies diminui à medida que a planta lenhosa passa de um estado juvenil para um estado adulto (TORRES, 2003). O rejuvenescimento das estacas e a consequente recuperação da capacidade de enraizamento são praticados rotineiramente no processo de enraizamento de eucalipto (SOL & SOLO, 1987).

Têm-se a necessidade cada vez maior de produzir mudas com características de resistência às condições adversas encontradas em áreas de reflorestamento, isto vem exigindo muito dos pesquisadores da área florestal, no sentido de se preocupar com um maior controle de qualidade das mudas (HOPPE *et al.*, 2004).

2.2.1 MINIESTAQUIA

A miniestaquia, aprimoramento da estaquia, é uma técnica que foi desenvolvida para plantas do gênero *Eucalyptus* no início da década de 90 e consiste em manter os genótipos selecionados em minijardim clonal (WENDLING & SOUZA JUNIOR, 2003). A aplicação desta técnica possibilita a propagação de espécies de difícil enraizamento, assim como promove um aumento na porcentagem de enraizamento e um sistema radicial mais vigoroso (ALFENAS *et al.*, 2004).

Atualmente, a miniestaquia constitui-se no método mais adotado pelas grandes empresas florestais brasileiras para a clonagem de *Eucalyptus* (ALMEIDA *et al.*, 2007). Consiste basicamente na quebra da dominância apical, a partir da poda da minicepa, a qual emite novas brotações, retiradas em intervalos variáveis em função da época do ano, condições estruturais e condições nutricionais, para formação de novas miniestacas e, por consequência, novas mudas (ALFENAS *et al.*, 2004).

Existe um grande interesse na introdução da técnica de miniestaquia para diversas espécies, para iniciar ou melhorar a adoção do uso de minijardim, a diminuição do período de enraizamento em casa de vegetação e principalmente a redução de reguladores vegetais na indução do enraizamento (HIGASHI *et al.*, 2000; XAVIER *et al.*, 2003; WENDLING *et al.*, 2005).

As miniestacas possuem normalmente dimensões que variam de 4 a 8 cm de comprimento, contendo de um a três pares de folhas, variável em função da espécie. As folhas geralmente são reduzidas pela metade, visando evitar o excesso de transpiração, facilitando a chegada da água de irrigação ao substrato (XAVIER *et al.*, 2009). O efeito das folhas nas miniestacas se dá na continuidade da fotossíntese, ou seja, fornecendo carboidratos, hormônios e outras substâncias necessárias para o

estímulo e crescimento de raízes adventícias (ONO & RODRIGUES, 1996; BIASI & COSTA, 2003; PAIVA & GOMES, 2011).

A propagação clonal de *Eucalyptus* pela técnica de miniestaquia é uma realidade em várias empresas florestais, onde é considerada estratégica por associar a qualidade da muda à redução dos custos de produção (SANTOS *et al.*, 2005). Existem relatos na literatura desenvolvidos por WENDLING (1999), TITON (2001), XAVIER *et al.* (2001) e WENDLING (2002), que avaliaram estas técnicas quanto a sua eficiência no processo de produção de mudas. Esta técnica é economicamente viável, além de apresentar maior acessibilidade de utilização por pequenos e médios produtores (FERRIANI *et al.*, 2010).

Em relação à técnica de estaquia convencional de *Eucalyptus*, a miniestaquia apresenta vantagens como a eliminação do jardim clonal a campo; maior facilidade no controle de patógenos, condições nutricionais e hídricas no minijardim; aumento da produtividade; aquisição de propágulos em menor tempo; uso de reguladores vegetais em menores concentrações ou até sua exclusão; melhor qualidade no vigor das raízes e redução do tempo na casa de vegetação e viveiro (WENDLING & SOUZA JUNIOR, 2003).

A miniestaquia, por utilizar propágulos mais juvenis, possibilita a obtenção de material vegetativo mais responsivo ao enraizamento adventício, dispensando muitas vezes a aplicação de auxina exógena, portanto, aproveita este potencial favorável ao enraizamento e consequentemente para a produção de mudas (FERRIANI *et al.*, 2010).

A diferenciação celular é o processo pelo qual as células adquirem propriedades metabólicas, estruturais e funcionais distintas daquelas das suas células progenitoras. Em plantas, ao contrário dos animais, a diferenciação celular é reversível. Essa capacidade de desdiferenciar demonstra que as células vegetais diferenciadas retêm a informação genética necessária para o desenvolvimento da planta completa (TAIZ & ZEIGER, 2013).

As fases do processo de desdiferenciação até a emergência radicial foram conceituadas por Hartmann *et al.* (2011):

1. *Desdiferenciação*: processo de alcançar um estado meristemático não diferenciado em células previamente diferenciadas, ou seja, é a capacidade de

células diferenciadas para iniciar divisão e formar um novo ponto meristemático de crescimento;

2. *Formação de raízes iniciais*: a partir das células diferenciadas ocorre a formação de raízes ainda não perceptíveis;
3. *Desenvolvimento dos primórdios de raiz reconhecíveis*: as raízes iniciais se desenvolvem e tornam-se perceptíveis, as quais proporcionarão o crescimento radicial;
4. *Crescimento e emergência radicial*: constitui-se no último estágio do enraizamento de estacas, em que ocorre a formação radicial suficiente para a sustentação da nova planta.

2.2.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NO ENRAIZAMENTO

2.2.2.1 ÉPOCA DO ANO

De modo geral, os propágulos podem ser coletados em qualquer época do ano, sendo o enraizamento, porém, determinado pelas condições fisiológicas da planta matriz e pelas condições climáticas durante a retirada do material a ser utilizado (KOMISSAROV, 1969). As raízes adventícias podem ser formadas a partir de diversos tecidos e células maduras que recuperam a atividade de divisão celular, desenvolvendo-se em meristema apical de raiz (LIMA *et al.*, 2011). O rejuvenescimento das plantas pode ser induzido por vários métodos, estimulando a desdiferenciação e posterior rediferenciação das células do câmbio, promovendo a formação de gemas (NEVES *et al.*, 2006).

Para que miniestacas enraízem é necessário uma certa quantidade de substâncias de reserva concentrada nos seus tecidos cambiais, bem como a época de coleta são determinantes para o sucesso no enraizamento. Para isso, Murayama (1973) recomenda realizar a coleta dos ramos durante o repouso vegetativo, principalmente no fim do inverno, pois nesta época os ramos estão bem desenvolvidos e com altos teores de substâncias de reserva. Em climas temperados, muitas espécies

cessam seu crescimento em épocas mais frias, reiniciando-o na primavera conforme a duração do dia e temperatura (NEVES *et al.*, 2006).

É importante ainda relacionar a estação do ano com as fases de desenvolvimento das plantas, visto que o estado bioquímico das miniestacas tem grande influência no enraizamento (MARTINS, 1998; FACHINELLO *et al.*, 2005). Segundo Howard (1996) as estações afetam as condições fisiológicas, estágio de crescimento, balanço hormonal e o grau de lignificação da planta matriz. Mudanças sazonais no enraizamento foram verificados em vários estudos e parecem estar relacionados com a variação sazonal na temperatura, nível de irradiância e/ou interação entre radiação solar e fotoperíodo (MOE & ANDERSEN, 1988).

Este efeito da estação do ano parece estar relacionado ao nível endógeno de auxina, e mesmo com a aplicação de reguladores vegetais essa relação é mantida (IRITANI *et al.*, 1986; ZUFFELLATO-RIBAS & RODRIGUES, 2001). Portanto, a comparação entre as estações do ano é importante para constatar a diferenciação celular, seguida da quantificação de auxinas disponíveis em cada estação do ano.

De modo geral, propágulos provenientes de plantas jovens enraizam com mais facilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Ressalta-se que temperaturas mais elevadas muitas vezes coincidem com o aumento da atividade das brotações, florescimento e maiores taxas de crescimento (KIBBLER *et al.*, 2004). Para Hartmann *et al.* (2011) estacas coletadas na primavera e verão tendem a ter maior facilidade de enraizamento em função do crescimento vegetativo desta época.

Existe ainda contradição quanto a melhor época de coleta do material vegetal, pois as espécies de fácil enraizamento podem ser coletadas em qualquer época do ano, enquanto que para algumas espécies o período de maior enraizamento coincide com a estação de repouso ou crescimento. Portanto, a época de coleta de material varia conforme o perfil de cada espécie (PAIVA & GOMES, 2001; ZUFFELLATO-RIBAS & RODRIGUES, 2001).

Ono & Rodrigues (1996) relatam a influência da estação do ano sobre o enraizamento de estacas, essa variação na capacidade de enraizamento é atribuída às fases de crescimento da planta e ao estado bioquímico das estacas. As variações sazonais modificam a atividade cambial, o estado fisio/morfológico da planta matriz, que altera os níveis hormonais endógenos e nutricionais, que favorecem o enraizamento, influenciando assim a resposta de enraizamento.

2.2.2.2 ÁCIDO INDOL ACÉTICO

O primeiro hormônio vegetal descoberto e identificado foi o ácido indol acético (IAA), conhecido por promover e favorecer o enraizamento adventício (WENT & THIMANN, 1934; HAISSIG, 1979; DAVIS & HAISSIG, 1994 citado por GASPAR *et al.*, 1997). Formado naturalmente em partes das plantas com crescimento ativo, tais como: meristema apical, gemas axilares e folhas jovens, é transportado através do floema para a base da estaca, e juntamente com outras substâncias nutritivas, são responsáveis pela formação das raízes, não necessitando de auxina exógena para a formação do sistema radicial (JANICK, 1966; HOPKINS, 1999; RAVEN *et al.*, 2002; SERRA *et al.*, 2007; HARTMANN *et al.*, 2011).

A formação de raízes na miniestaca depende das condições internas da planta-matriz e do meio em que são colocadas. A capacidade que a miniestaca tem para formar raízes é devida à ação de substâncias naturais reguladoras do crescimento presentes nas células, folhas e gemas. Há vários grupos destas substâncias, dentre eles as auxinas, as citocininas e as giberelinas. Dentre estes, as auxinas são de maior interesse no que diz respeito à formação de raízes na propagação vegetativa.

De acordo com Alvarenga & Carvalho (1983), o modo de ação da auxina envolve na síntese de proteínas, que podem agir como enzimas, promovendo o alongamento das células a certa distância do ápice. A formação natural de raízes é, aparentemente, dependente de um nível ótimo de auxina em relação aos açúcares e outras substâncias nutritivas. Em numerosas plantas, o enraizamento é grandemente aumentado pela adição de auxinas sintéticas, porém a auxina não é somente uma substância promotora do crescimento, mas também inibidora (SKOOG, 1980).

As auxinas podem ser encontradas naturalmente nos vegetais sob a forma livre ou conjugada, sendo IAA na forma livre a forma biologicamente ativa deste hormônio. Quando conjugado, ligado à glicosídeos, o IAA serve basicamente como reserva, e quando conjugado com proteínas ou aminoácidos é utilizado para desintoxicação (ARTECA, 1995; TAIZ & ZEIGER, 2013). Espécies com dificuldade de enraizamento, como as lenhosas, produzem e metabolizam mais rapidamente o IAA quando comparadas às espécies com maior facilidade de enraizamento. Este fato indica a baixa concentração de IAA livre e/ou conjugado para ser transportado para a base da

estaca, local de ação do hormônio, ou seja, onde ocorrerá o enraizamento (EPSTEIN & LAVEE, 1983; FORD *et al.*, 2002).

A auxina, além de atuar nas células envolvidas na iniciação do primórdio radicial, pode atuar na movimentação direcional dos nutrientes. Assim, a acumulação do IAA na base das estacas pode afetar no acúmulo de outros compostos necessários para o enraizamento (BORTOLINI, 2006). Considerando que a formação de raízes é um processo de crescimento que necessita de nutrientes, é importante que haja equilíbrio da auxina com carboidratos e compostos nitrogenados (ONO & RODRIGUES, 1996).

2.2.2.3 COMPOSTOS BIOQUÍMICOS

Acredita-se, cada vez mais, que existem fatores endógenos, além das auxinas, controlando o processo de enraizamento, no qual proteínas, carboidratos, aminoácidos, vitaminas e compostos fenólicos contribuem para a iniciação de raízes adventícias, quando combinados em teores e proporções adequadas (BREEN & MURAOKA, 1985; ONO & RODRIGUES, 1996). Supõe-se que a fase de iniciação radicial é totalmente dependente do gasto de reservas existentes na miniestaca, ou seja, quanto mais reservas a miniestaca possuir nas estações anteriores (outono e inverno) maior será o potencial rizogênico da espécie (HARTMANN *et al.*, 2011).

Durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, os açúcares participam de uma gama de processos vitais como a germinação de sementes, desenvolvimento de plântulas, diferenciação radicular e foliar, transição foliar, amadurecimento de frutos, embriogênese, senescência, assim como respondem às variações de luz, estresse e patógenos (LEÓN & SHEEN, 2003). A iniciação radicular requer energia, portanto altos níveis de carboidratos nas estacas têm sido relacionados como importantes para obtenção de sucesso e maior velocidade no enraizamento (GOMES, 1987; CHALFUN, 1989).

O teor de carboidratos totais é uma das variáveis que reflete na habilidade dos propágulos vegetais ao enraizamento, pois são fonte de energia para produção de novos produtos metabólicos, ácidos nucleicos e proteínas, podendo interferir no

número de raízes formadas (VEIERSKOV, 1988). Portanto, o conteúdo de açúcar aumenta na base das estacas por causa do aumento do transporte basípeto de açúcares, previamente existentes nas folhas das mesmas, elevando sua disponibilidade no sítio de desenvolvimento do primórdio radicial (ALTMAN & WAREING, 1975; DAVIS & POTTER, 1981; LIMA *et al.*, 2011). Quanto as proteínas, Ribas (1997) indica a coleta de ramos nas estações do ano em que apresentarem maiores teores de proteínas, o que verificado em *Eucalyptus grandis* seria nas épocas de primavera e inverno.

As reservas de carboidratos livres (carboidratos solúveis) e carboidratos de armazenamento (amidos ou carboidratos insolúveis) são importantes no enraizamento, constituindo complexos blocos de macromoléculas, elementos estruturais e recursos energéticos (DIAS *et al.*, 2011).

Conforme Rowe *et al.* (2002), as reservas mais abundantes de carboidratos correlacionam-se com maiores porcentagens de enraizamento e sobrevivência de estacas. Assim, a real importância dos carboidratos para formação de raízes é que a auxina requer fonte de carbono para a biossíntese de ácidos nucléicos e proteínas, levando à necessidade de energia e carbono para formação das raízes (FACHINELLO *et al.*, 1995).

Os co-fatores do enraizamento são considerados substâncias endógenas, capazes de atuar sinergisticamente com o IAA no enraizamento de estacas (YOSHIKAWA *et al.*, 1986). Hartmann *et al.* (2011) relatam que as gemas laterais metabolicamente ativas e a formação de brotos influencia diretamente no enraizamento, os quais se tornam prejudiciais ao enraizamento, onde estes brotos passam a consumir as reservas energéticas da estaca para sua formação.

2.2.2.4 OUTROS FATORES

Aparentemente, a demanda por energia e carbono estrutural para suportar o enraizamento varia entre espécies depende muito do tipo de estaca. Por exemplo, estacas de folhosas podem requerer semanas ou meses para enraizar ao mesmo tempo em que podem produzir uma porção alta ou baixa de gemas e sofrer substancial

aumento em massa. Em contrapartida, estacas de muitas herbáceas iniciam primórdios rapidamente, com pequeno acréscimo de massa (HAISSIG, 1983; MONTAIN *et al.*, 1983; HAISSIG, 1984).

Um fator que influi na facilidade, proporção e velocidade de enraizamento é a posição em que as miniestacas ocupam na árvore e o ramo de onde foram retiradas. Os ramos laterais enraízam mais rapidamente que os ramos apicais, em virtude de contarem com uma maior disponibilidade de carboidratos; fato similar ocorre com a porção basal de ramos em relação à porção terminal (SILVA, 1998).

Outro fator importante é a escolha do substrato, pois este exercer grande influência no processo de enraizamento. De modo geral, seu papel é sustentar o material durante o período de enraizamento oferecendo condições de umidade, aeração e a formação de um bom sistema radicular de maneira a assegurar um bom desenvolvimento da muda quando plantada no campo (VALLE, 1978; XAVIER, 2002). O substrato deve ser constituído de material que propicie drenagem satisfatória, mantendo em equilíbrio a porcentagem entre água e ar, evitando o apodrecimento da base das miniestacas (IKEMORI, 1975; VALLE & CALDEIRA, 1978).

A presença das folhas nas miniestacas é necessária para a produção de auxinas e co-fatores do enraizamento, os quais são translocados para a base das miniestacas contribuindo para o processo morfogênético de formação de novas raízes (COUVILLON, 1988; HARTMANN *et al.*, 2011). Miniestacas com folhas, em geral, respondem com maior sucesso ao enraizamento, apresentando maior número e comprimento de raízes (XAVIER *et al.*, 2003).

A juvenilidade do material vegetal está diretamente relacionado ao sucesso do enraizamento, pois quanto mais juvenis e menos lignificados os propágulos maior será a rapidez de formação e qualidade das raízes, bem como pela capacidade de crescimento da nova planta. Por isso, a aplicação de estimuladores de enraizamento em miniestacas só se justifica quando o material vegetativo não apresenta facilidade de enraizar (XAVIER & COMÉRCIO, 1996; WENDLING *et al.* 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MINIESTAQUIA

O experimento de enraizamento foi conduzido na casa de vegetação do Laboratório de Propagação de Espécies Florestais da Embrapa Florestas, em Colombo – PR. Foram selecionados *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh e os híbridos *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake x *Eucalyptus grandis* W. Hill (*Eucalyptus urograndis*) e *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunni* Maiden para o experimento de enraizamento, a partir de minicepas em franca produtividade em sistema de semi-hidroponia do tipo canaletão (Figura 1).

Os dados meteorológicos da região durante os meses de instalação dos experimentos de enraizamento apresentaram temperatura mínima média de 15,62 °C para o ano de 2015 e de 13,5 °C no ano de 2016. A média máxima foi de 36,8 °C em 2015 e de 35,3 °C para 2016.

As coletas das brotações foram realizadas a partir de minicepas das espécies de *Eucalyptus* selecionadas em minijardim clonal realizadas no segundo mês de cada estação do ano: outono (maio/2015), primavera (novembro/2015), verão (fevereiro/2016) e inverno (julho/2016), sempre realizadas no período da manhã.

A partir das minicepas foram confeccionadas 80 miniestacas para cada espécie de *Eucalyptus*, com 6 cm de comprimento e duas folhas com sua área reduzida à metade na parte apical, realizando corte em bisel na base e reto no ápice. Para manter a turgescência do material, estes foram acondicionados em recipientes com água até o momento do plantio. O tratamento fitossanitário foi dispensado devido ao ambiente onde as minicepas se desenvolveram ser controlado.



Figura 1: Minicepas de *Eucalyptus* em sistema semi-hidropônico do tipo canaletão e suas brotações para confecção das miniestacas coletadas em quatro épocas, Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2016.



Figura 2: Casa de vegetação com experimentos de enraizamento, Embrapa Florestas, Colombo –PR, 2016.

Após 30 dias da instalação dos experimentos foram avaliadas as variáveis:

- 1) Porcentagem de miniestacas enraizadas (miniestacas vivas que emitiram raízes de pelo menos 0,1 mm de comprimento);
- 2) Número de raízes formadas por miniestaca;
- 3) Comprimento médio das três maiores raízes formadas por miniestaca;
- 4) Porcentagem de miniestacas com calos (miniestacas vivas, sem raízes e com massa de células indiferenciada na base);
- 5) Porcentagem de miniestacas vivas (miniestacas vivas sem raízes ou calos);
- 6) Porcentagem de miniestacas mortas;
- 7) Porcentagem da permanência das folhas (miniestacas que mantiveram o par de folhas desde a instalação do experimento);
- 8) Porcentagem de miniestacas brotadas (miniestacas que emitiram brotações de pelo menos 0,3 mm);
- 9) Porcentagem de miniestacas enraizadas e com calos (miniestacas que emitiram raízes e mesmo assim apresentaram calos no momento da avaliação).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos (outono/2015, primavera/2015, inverno/2016, e verão/2016) e 4 repetições de 20 miniestacas por unidade experimental para cada clone isoladamente. As variáveis de enraizamento, proteínas, açúcares totais e IAA, foram analisadas separadamente por espécie e por estação do ano. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância no programa estatístico ASSISTAT versão 7.7.

As variâncias foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett. As variáveis cujas variâncias se mostraram homogêneas foram submetidas à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foram calculados os coeficientes de Correlação de Pearson para cada espécie estudada, bem como para os dados de todos os clones em conjunto, utilizando o programa estatístico SPSS versão 17.0.

3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS MINIESTACAS

3.2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS (SECAGEM E TRITURAÇÃO)

No momento da instalação dos experimentos de enraizamento foram coletadas juntamente as brotações para confecção de 60 miniestacas/espécie para a realização de todas as análises bioquímicas (proteínas, açúcares totais e IAA), ou seja nas quatro estações do ano (outono/2015, primavera/2015, inverno/2016 e verão/2016). Todas as análises bioquímicas das miniestacas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Produtos Não Madeiráveis da Embrapa Florestas, Colombo – PR.

O material vegetal para as análises de proteínas e açúcares totais foram triturados, logo após a coleta, utilizando o moinho elétrico homogeneizador de tecidos, e armazenados em Freezer -80 °C. Já o material para extração de ácido indol acético (IAA) foram submetidos ao processo de liofilização (desidratação das miniestacas realizada em baixa temperatura) por 72 horas, após isso foram triturados e armazenados em Ultrafreezer Sanyo a -80 °C (modelo: MDFU54VC) até o momento da análise.

3.2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação de proteínas foi realizada a partir da metodologia clássica de Kjeldahl, onde foram pesados 0,5 g de amostra triturada em triplicata dos três clones de *Eucalyptus* e transferidas para o tubo digestor, onde foram adicionados 0,5 g de catalisador (Na_2SeO_3 , CuSO_4 e Na_2SO_4) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. As amostras foram digeridas em bloco digestor Tecnal à 350 °C por 3 horas, até ficarem completamente transparentes e, após atingirem temperatura ambiente, adicionou-se 15 mL de água destilada acoplando o tubo ao sistema de destilação de nitrogênio (BRASIL, 2005).

O teor de proteínas foi calculado após destilação do nitrogênio, onde as amostras foram tituladas com ácido clorídrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e os valores de titulação utilizados para calcular o valor de Nitrogênio total (N_T) e de Proteínas totais (P_T) das amostras, seguindo as equações:

$$N_T = (V \times 0,14 \times f) / P \quad (1)$$

$$P_T = N_T \times F \quad (2)$$

Onde:

V = volume de ácido clorídrico gasto na titulação

f = fator de correção do ácido clorídrico

P = massa da amostra em gramas

F = fator de conversão de nitrogênio total em proteínas (6,25)

3.2.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AÇÚCARES TOTAIS

A determinação de açúcares totais foi realizada a partir da metodologia de Dubois *et al.* (1956), onde as amostras de *Eucalyptus* foram trituradas em moinho analítico IKA (modelo: A11BS1) por aproximadamente 60 segundos. Após a moagem, foi pesado 1,0 g de amostra e macerado em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,5 e, em seguida filtrado em papel filtro quantitativo (15 cm de diâmetro). Em um tubo de ensaio foram adicionados 10 µL do extrato, 490 µL de água destilada,

0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de H₂SO₄. Após o resfriamento da solução, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu-1800 a 490 nm e comparadas com uma curva-padrão de glicose (100 µg mL⁻¹).

3.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (IAA)

As miniestacas de *Eucalyptus* coletadas foram secas por liofilização durante 72 horas e armazenados em Ultrafreezer Sanyo a -80 °C. Para a liofilização foi utilizado o liofilizador do Departamento de Química, do Setor de Ciências Biológicas, Campus III da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba-PR. O material vegetal foi triturado, utilizando homogeneizador de tecidos e pesado 0,30 g em triplicata, armazenado em frasco âmbar de 5 mL. A extração e purificação foram efetuadas de acordo com metodologia de Wendling *et al.* (2015).

A extração foi realizada com uma solução de MeOH:H₂O (70:30 v/v) contendo 0,1 mg L⁻¹ de 2,6-t-butil-4-metil-fenol (BHT) ao qual foram adicionados 10 µL de ácido indol acético hepta deuterado (IAA-D7). Este, foi adicionado como padrão interno para constatar tempos de retenção cromatográficos e posterior quantificação.

As amostras foram deixadas em atmosfera inerte com nitrogênio gasoso (N_{2(g)}) *over night* a 4°C. Após 24 horas, a solução sobrenadante foi transferida para tubo de ensaio e centrifugada a 1.000 rpm por 5 minutos. As soluções foram transferidas para balão de fundo redondo de 25 mL e concentradas a 2 mL no evaporador rotativo a vácuo, gerando um resíduo aquoso.

O pH das amostras foi ajustado para 8-9 com hidróxido de sódio (0,5 mol L⁻¹) e a camada aquosa foi descartada duas vezes com 1 mL de acetato de etila. Após isso, o pH foi reajustado para 2,5 com ácido clorídrico (0,5 mol L⁻¹) e a solução extraída com éter dietílico (solução com 0,1 mg mL⁻¹ de BHT), dividida três vezes com 1 mL, filtrada em sulfato de sódio anidro. As amostras filtradas foram secas sob fluxo lento de N_{2(g)} até a secagem completa, e o resíduo foi dissolvido em diclorometano (DCM) na formação da reação para análise em cromatografia gasosa.

O resíduo foi dissolvido novamente em 300 µL de DCM e todo o conteúdo transferido para vials de 2 mL e secos sob fluxo lento de N_{2(g)}. Por fim, os extratos

foram dissolvidos com 85 μL de DCM e derivatizados com 15 μL de TBS (N-t-butildimetilsilil-N-metil-trifluoro-acetamida contendo 1% de t-butil-dimetil-clorosilano) por 1 hora, em temperatura de 65°C. Uma vez que a reação tem durabilidade de seis horas, deve-se fazer a leitura em cromatografia neste intervalo de tempo.

Juntamente com as amostras foram também preparadas soluções-padrão da substância de interesse (IAA) na concentração de 0,001 mg mL⁻¹. Adicionou-se uma quantidade conhecida (10 μL) de padrão interno hepta deuterado (D7) nas amostras de *Eucalyptus*, onde a concentração de ácido indol acético foi calculada (ng g⁻¹) com base na área dos picos fornecida em comparação com a área do padrão interno ácido indol acético hepta deuterado. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa e espectroscopia de massa (GC-MS), onde a identificação do pico hormonal foi baseada no tempo de retenção e espectros de massa gerados pela dissociação por colisão induzida dos íons.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Eucalyptus camaldulensis*

4.1.1 MINIASTAQUIA

As miniestacas de *Eucalyptus camaldulensis* apresentaram um sistema radicial bem formado após período de condução de 30 dias em casa de vegetação, com grande quantidade de raízes secundárias, resultando na maior agregação ao substrato podendo ser observado na Figura 3A. Na miniestaca enraizada (Figura 3B) percebeu-se as características como a presença de calo com formato diferenciado (Figura 3C), raízes longas (de até 33 cm de comprimento), grossas e resistentes. O potencial rizogênico foi considerado elevado (98%) e constante entre as estações do ano, confirmando a espécie apropriada para produção de mudas em qualquer época de coleta do material vegetal.

De acordo com os resultados observados pelo teste Tukey (Apêndice 1), considerou-se as estações mais indicadas para a realização da miniestaquia em *E. camaldulensis* por apresentarem elevado potencial rizogênico, o verão/2016 (98,75%), primavera/2015 (97,5%), outono/2015 (96,25%) e inverno/2016 (85%), sendo considerado os mais efetivos na promoção do sistema radicial devido ao melhor aproveitamento de auxinas endógenas, assim como o de açúcares, proteínas e compostos fenólicos presentes na miniestaca.

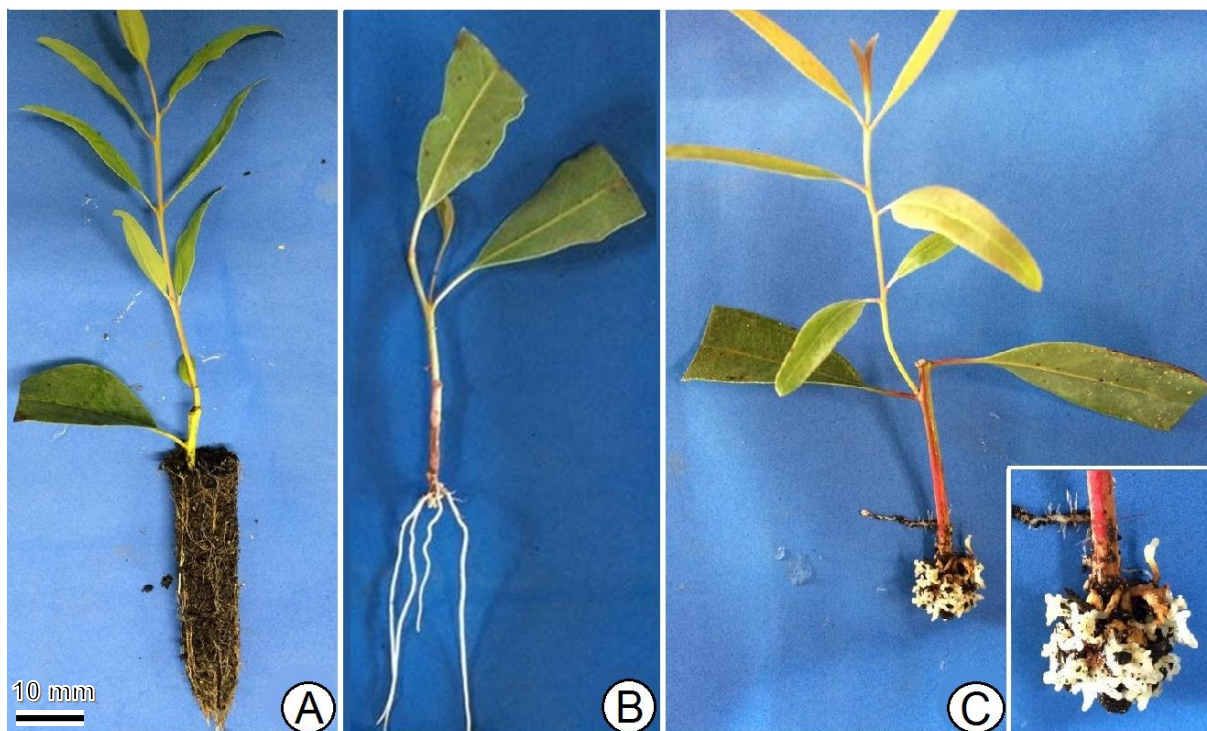


Figura 3: Miniestaca de *Eucalyptus camaldulensis* enraizada retirada do tubete e com substrato comercial (A), miniestaca enraizada e com a permanência do par de folhas iniciais (B), miniestaca enraizada, com calos e brotação (C), todas após período de 30 dias em casa de vegetação, Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2016.

A maior porcentagem de enraizamento ocorreu nas estações de verão, primavera e outono, não diferindo estatisticamente entre elas (Figura 4). No entanto, apresentaram diferença estatística apenas no inverno, o qual apresentou menor valor médio para esta variável de 85%. Estes valores podem estar relacionados ao fato de as miniestacas terem sido expostas anteriormente a um período de repouso vegetativo, proporcionando acúmulo de carboidratos e maior atividade metabólica, favoráveis à formação de raízes. Os meses mais quentes estão associados à fase de maior atividade metabólica, propiciando maior porcentagem de enraizamento. Com base nesses resultados, evidencia-se o efeito positivo da juvenilidade na formação do sistema radicial adventício, possibilitando a propagação vegetativa de *E. camaldulensis* para fins comerciais, por meio de miniestaquia.

Resultados semelhantes foram relatados por Alcantara *et al.* (2008), onde observaram que a porcentagem de enraizamento de *Pinus taeda* foi maior em propágulos coletados no verão e primavera. Já os resultados obtidos por Brondani *et al.* (2010a), demonstraram que o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* variou entre espécies e mostrou-se sensíveis ao efeito

da sazonalidade, pois as maiores porcentagens de enraizamento foram registrados nas estações mais frias, ou seja, no outono (77%) e inverno (73%).

A época mais favorável ao enraizamento de estacas de eucalipto se inicia na primavera, época em que o material a ser estaquiado encontrará melhores condições nutricionais, portanto estarão mais aptas ao enraizamento (VALLE & CALDEIRA, 1978 citados por TORRES, 2003).

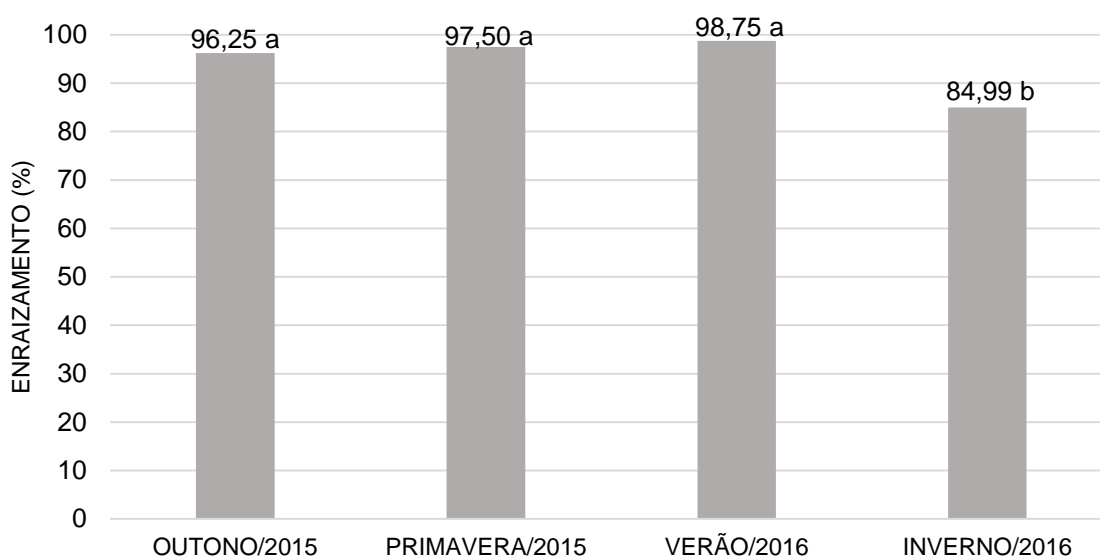


Figura 4: Porcentagem de enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus camaldulensis*, avaliadas nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O maior potencial de enraizamento de materiais provenientes de minijardim clonal se dá devido ao rejuvenescimento das minicepas. Dessa forma, Xavier *et al.* (2009) esclarecem que o rejuvenescimento promovido pela miniestaquia seriada tem sido eficiente na forma de reverter, ainda que parcialmente, o envelhecimento ontogenético observado em *Eucalyptus*, principalmente em relação à materiais que apresentam elevada dificuldade de enraizamento.

Wendling & Xavier (2005) verificaram o aumento no número de raízes e maior vigor radicial em clones de *Eucalyptus grandis*, de menor potencial de enraizamento, quando foram submetidos à miniestaquia seriada, indicando, assim, um melhor desenvolvimento do sistema radicial quanto maior o grau de juvenilidade das miniestacas.

A habilidade dos tecidos das plantas para a formação de raízes adventícias depende de diferentes fatores endógenos e exógenos e da interação entre eles. Com isso, Borges *et al.* (2011) obtiveram resultados superiores de enraizamento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* com miniestacas apicais (99%) ao ser comparado à miniestacas intermediárias (56%) por estar relacionado, dentre outros fatores, à menor lignificação dos tecidos desses propágulos.

Vários autores observaram que a época de coleta de propágulos tem grande influência no sucesso do enraizamento. A influência da época do ano pode ocorrer também devido à formação e acúmulo de promotores ou inibidores do enraizamento (MUNÕZ & VALENZUELA, 1978; FACHINELLO *et al.*, 1994; KERSTEN *et al.*, 1994).

Embora as épocas do outono, primavera e verão não tenham apresentado valores significativamente diferentes para porcentagem de miniestacas enraizadas, a variável número de raízes por miniestaca foi superior no outono (12,9 raízes/miniestaca) e para comprimento médio das três maiores raízes nas estações primavera (13,2 cm) e verão (9,8 cm), observados na Tabela 2. Estes resultados sugerem que brotações coletadas no outono apresentam desempenho adequado aos esperados de mudas a campo, por possuírem raízes bem desenvolvidas com melhor aproveitamento dos nutrientes do solo e assim contribuindo para o melhor crescimento das mudas.

Tabela 2: Porcentagem de miniestacas de *Eucalyptus camaldulensis* enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas, (MM), permanência do par de folhas (PF) e miniestacas brotadas (MB) a partir de material vegetal coletado em quatro épocas.

Épocas	ME	NR	CM	MC	MV	MM	PF	MB
OUTONO 2015	96,25 a	12,93 a	7,90 b	0,00 a	2,50 a	1,25 a	82,5 a	85,0 a
PRIMAVERA 2015	97,50 a	5,74 b	13,25 a	2,50 a	0,00 a	0,00 a	100,0 a	93,75 a
VERÃO 2016	98,75 a	4,07 b	9,84 ab	1,25 a	1,25 a	2,50 a	81,25 a	70,0 b
INVERNO 2016	84,99 b	6,58 b	1,84 c	15,0 a	0,00 a	0,00 a	93,33 a	93,33 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Kratz *et al.* (2012) comparando o número e comprimento das raízes de miniestacas de *E. benthamii* x *E. dunnii* em diversas combinações de substratos a base de casca de arroz carbonizada, obtiveram em média 3,2 raízes por miniestaca e o comprimento de 7,4 cm. Borges *et al.* (2011) relataram que a variação do número

de raízes por miniestacas de *E. globulus* foi de 1,3 a 7,3 raízes em miniestacas apicais, enquanto as intermediárias apresentaram valores entre 1,2 e 2,6 raízes por miniestaca. Valores de acordo com os obtidos por Schwambach *et al.* (2008) em estudo do clone de *Eucalyptus globulus* x *maidennii*.

Pacheco *et al.* (1998) caracterizaram calos como tecido caloso meristematicamente ativo, representado por diversas camadas de células com aspecto parenquimático, podendo ter grande acúmulo de amido devido à necessidade alta de energia para o processo organogenético. Já Ono *et al.* (1992) afirmam que a calogênese não é interessante, pois os calos formados em estacas de *Coffea arabica* não se diferenciaram em raízes.

A formação de raízes adventícias pode ocorrer de forma direta, pela diferenciação de células próximas ao sistema vascular, que ocorre nos eixos caulinares em função dos níveis de auxina; ou indireta, quando as células de divisão não orientadas formam calos que permanecem assim por um período e depois, ao se dividirem de forma organizada, iniciam a raiz primária (HARTMANN *et al.*, 2011; KERBAUY, 2004).

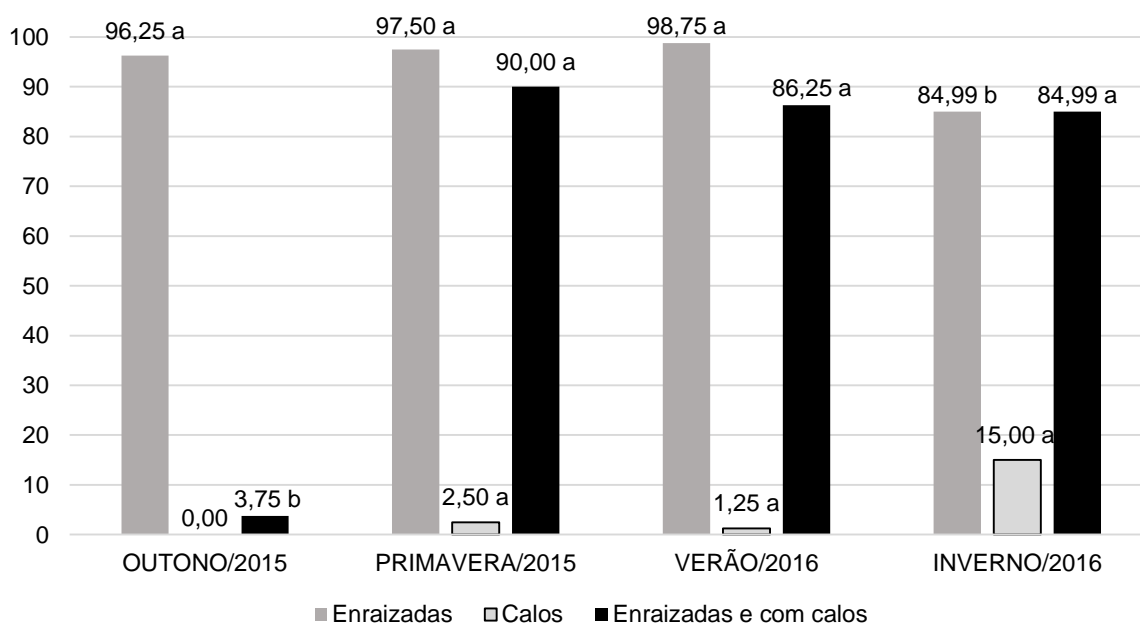


Figura 5: Porcentagem de miniestacas enraizadas, miniestacas com calos e miniestacas enraizadas e com calos de *Eucalyptus camaldulensis* nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar na Figura 5 elevada porcentagem de miniestacas enraizadas e simultaneamente com calos nas estações de primavera (90%), verão (86,2%) e inverno (85%), ou seja, fez-se primeiramente o calo na parte basal da miniestaca (massa de células indiferenciadas) e logo em seguida a emissão de raízes a partir destes. Logo, constatou-se que a formação de calos não afeta o sucesso de enraizamento das miniestacas. Portanto, o enraizamento de *E. camaldulensis* ocorre de modo indireto.

Bitencourt *et al.* (2009) observaram que estacas de *Ilex paraguariensis* provenientes de brotação do ano apresentaram maior porcentagem de estacas com calos (17,75%), porém obtiveram menores taxas de enraizamento. Ribeiro (2009) realizando pesquisas com diversas espécies via estaquia e in vitro concluiu que os processos de calogênese e rizogênese se completam dependendo da espécie.

Em geral, verificou-se baixa mortalidade em todas as épocas do ano, e as miniestacas coletadas no verão e outono foram as que apresentaram os maiores índices, variando de 1,25 a 2,5% (Tabela 2). Com relação à porcentagem de miniestacas vivas (miniestacas sem indução radicial e sem a formação de calos), observaram-se os maiores índices no experimento instalado no outono e verão. As duas variáveis (miniestacas vivas e mortas) não apresentaram diferenças estatísticas entre as épocas do ano avaliadas.

Wendling *et al.* (2007) utilizaram de minicepas de *Ilex paraguariensis* mantidas em minijardim clonal obtiveram 85,6% de sobrevivência das mudas a partir da realização da miniestaquia. A sobrevivência das miniestacas de *E. globulus* foi de 91%, evidenciando o adequado controle das condições ambientais na casa de vegetação (BORGES *et al.*, 2011).

As miniestacas de *E. camaldulensis* apresentaram alta porcentagem de permanência das folhas iniciais (deixadas na confecção das miniestacas) em todas as épocas de coleta, não demonstrando diferença estatística entre as estações (Tabela 2), com valores de 82,50% e 81,25% nas estações outono e verão e 100% de permanência do par de folhas na estação primavera. O desenvolvimento de brotações foi superior a 70%, valor observado no verão, o qual apresentou diferença estatística em relação as demais estações do ano.

O par de folhas deixado nas miniestacas possui papel fundamental na influência do enraizamento e isto vem sendo discutido em diversos estudos, podendo

ser correlacionado com alguns fatores endógenos da estaca, como por exemplo a produção de carboidratos, compostos nitrogenados e substâncias sinérgicas da auxina (ONO & RODRIGUES, 1996).

Carvalho *et al.* (2007) relataram que estacas herbáceas apresentam maior necessidade de velocidade de cicatrização dos tecidos lesionados, papel fundamental das folhas mantidas na estaca, pois favorecem o fluxo de reservas à região lesionada para a retomada do crescimento. Leandro & Yuyama (2008), estudando a propagação vegetativa de *Coupeia edulis* concluíram que estacas herbáceas deixadas com folhas inteiras e/ou folhas reduzidas à metade apresentaram maiores percentuais de enraizamento.

Estes resultados diferem por completo aos encontrados por Pio *et al.* (2005), que avaliaram o desenvolvimento e número de brotações em função da presença do número de folhas em estacas de *Olea europaea* L., onde as estacas deixadas sem folhas apresentaram os melhores resultados de desenvolvimento de brotações (75%).

4.1.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS MINISTACAS

4.1.2.1 TEORES DE PROTEÍNAS E AÇÚCARES TOTAIS

A determinação de proteínas e açúcares totais em ministacas de *E. camaldulensis* foram realizadas com o objetivo de verificar sua participação no enraizamento, assim como sua correlação com o crescimento de calos e desenvolvimento de brotações. A Figura 6 apresenta os resultados de proteínas totais ao longo das quatro estações do ano estudadas. De acordo com os resultados observados pelo teste Tukey (Apêndice 2) a época de coleta correspondente a estação de outono apresentou maior produção de proteínas totais ($6,33 \text{ g} \cdot 100^{-1}$), seguido da primavera com $4 \text{ g} \cdot 100^{-1}$. Já o maior teor de açúcares totais foi observado na estação inverno ($688,65 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), seguido do outono com $159,49 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (Figura 8). Breen & Muraoka (1985) citam que, no enraizamento, há pronunciado aumento de açúcares e diminuição na concentração de amido, por meio de hidrólise.

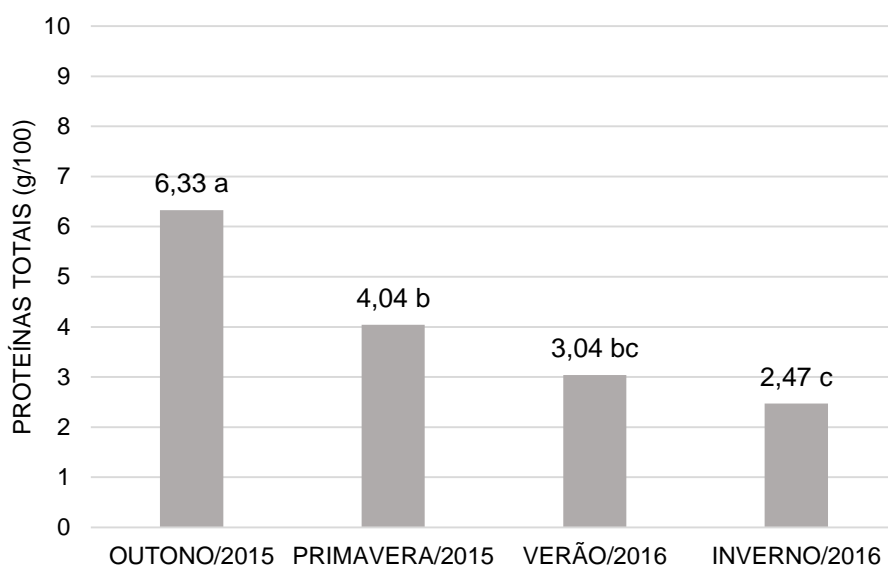


Figura 6: Teores de proteínas totais em base seca de miniestacas de *Eucalyptus camaldulensis* coletadas nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os maiores teores de proteínas, no período de repouso vegetativo, estão relacionados ao acúmulo de proteínas estruturais, e estão presentes na parede secundária das células. Existem algumas enzimas presentes nesta concentração de proteínas estruturais; sendo uma delas a IAA-oxidase, responsável pela degradação do ácido indol acético e regulação das taxas hormonais da planta (WACHOWICZ & CARVALHO, 2002).

Dentre os vários fatores que podem influenciar o enraizamento de miniestacas caulinares, a auxina produz um efeito estimulador de raízes, translocando os carboidratos para a área basal da miniestaca, aumentando a taxa de respiração e ocorrendo transformações dos carboidratos. As reservas de amido e a fotossíntese constituem a fonte de carboidratos nos tecidos das miniestacas; sendo assim, são mobilizados durante o processo de iniciação da formação de raízes (FERRI, 1997, HARTMANN *et al.*, 2011).

Estes resultados confirmam com os encontrados por Ferriani (2006), onde os maiores teores de açúcares totais foram obtidos no outono (580 mg.g^{-1}) e inverno (350 mg.g^{-1}) para *Piptocarpha angustifolia* Dusén, sendo justificado por se tratar das reservas acumuladas nos tecidos para serem gastas nos pecíolos de florescimento e frutificação.

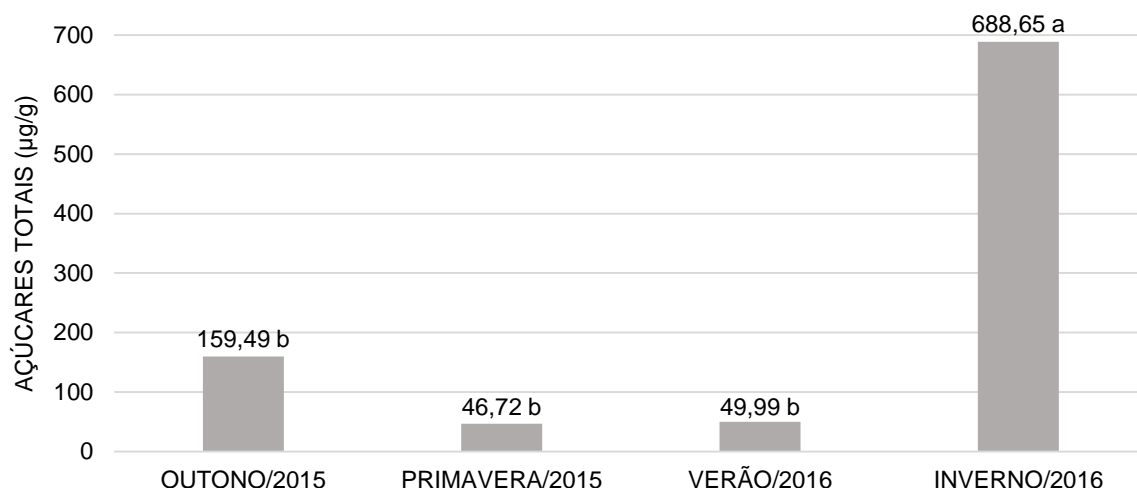


Figura 7: Teores de açúcares totais em base seca de miniestacas de *Eucalyptus camaldulensis* coletadas nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O conteúdo de carboidratos depende do balanço entre a produção média de carboidratos na fotossíntese e o uso desses carboidratos no crescimento e respiração (CRANSWICH *et al.*, 1997). Em estudo com *Pinus radiata*, Grace *et al.* (1997) demonstraram que a fotossíntese de uma planta ao longo dos dias de verão (entre novembro e janeiro) é aproximadamente três vezes maior que dos curtos dias de inverno (junho e julho).

Gholz & Cropper Junior (1991), estudaram o padrão sazonal e a dinâmica de carboidratos em diferentes tecidos de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e demonstraram que o amido apresentou marcante e similar sazonalidade em todos os tecidos, com máxima no fim do inverno perto da época do crescimento reiniciado na primavera. Já os resultados obtidos por Torres (2003) sugerem que o ganho em açúcares pode ter propiciado um aumento médio na biomassa seca das mudas de *E. saligna* de 1,47 mg.g⁻¹ (inverno) para 3,5 mg.g⁻¹ (verão) e para *E. grandis* de 2,1 mg.g⁻¹ (inverno) para 5,1 mg.g⁻¹ (verão), o que proporcionou incremento de 140% em biomassa para estes clones.

4.1.2.2 TEORES DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (IAA)

As concentrações de IAA foram calculadas a partir da área dos picos hormonais baseada no tempo de retenção gerados por dissociação de colisão induzida de íons entre as amostras de padrão interno (D7) e IAA. Estes picos podem ser observados na Figura 8, onde tem-se os cromatogramas gerados após a corrida total de íons por cromatografia gasosa e espectroscopia de massa.

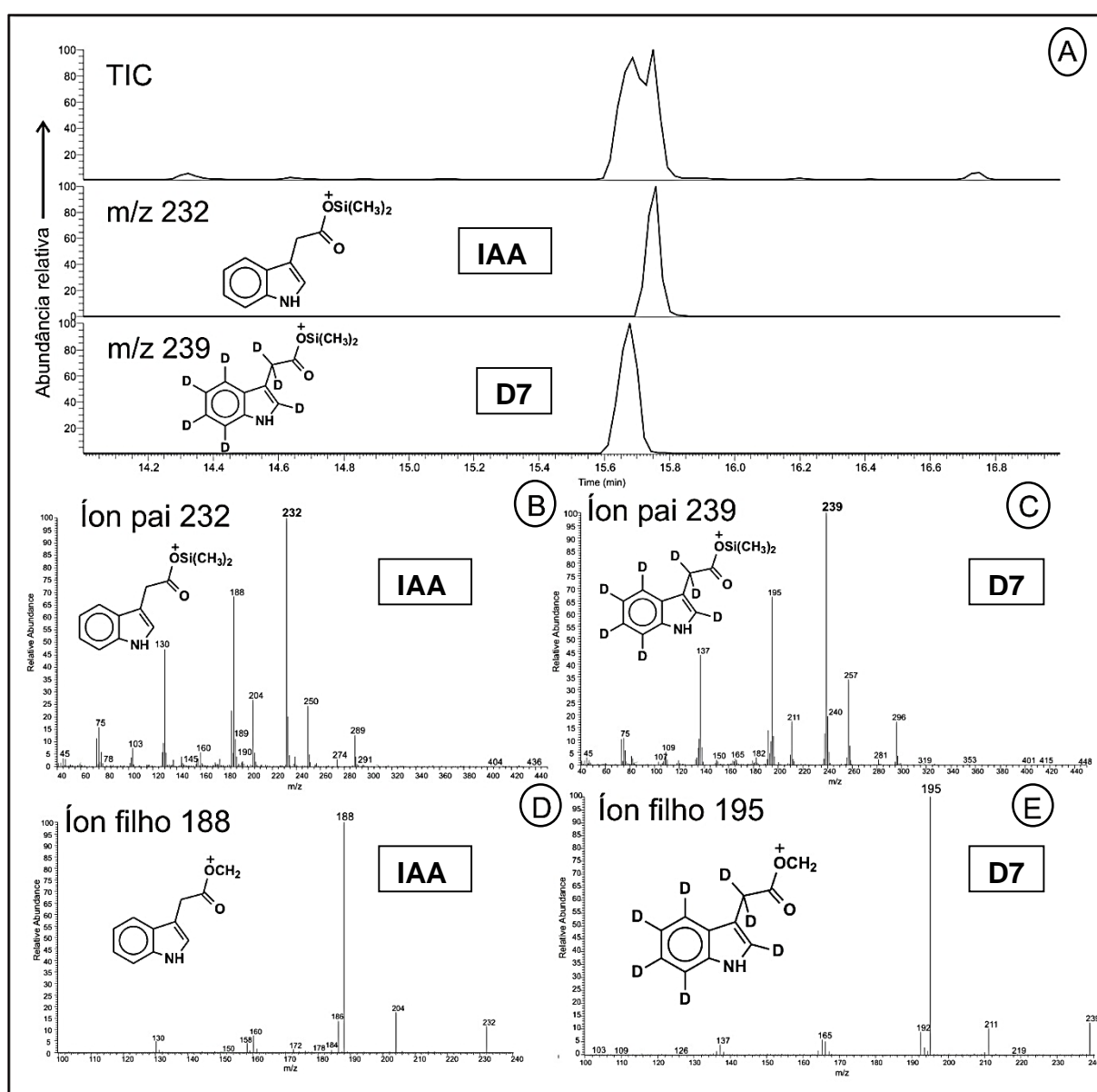


Figura 8: Cromatogramas: Corrente Total de Íons (TIC) (A); Fragmentos dos íons pais característicos: IAA (B) e padrão D7 (C); espectros de massas dos íons pais após dissociação por colisão induzida de íons filho: IAA (D) e padrão D7 (E).

Os teores de ácido indol acético foram considerados altos ($199,81 \text{ ng.g}^{-1}$ a $512,96 \text{ ng.g}^{-1}$) em todas as épocas do ano estudadas, além de não diferirem estatisticamente entre si (Figura 9). O potencial de enraizamento ao ser comparado com os valores obtidos de IAA demonstrou ter relação bioquímica direta na emissão de raízes nas miniestacas, onde em todas as estações foram quantificados altos teores de IAA livre e apresentaram um ótimo enraizamento das miniestacas (de 85 a 98,75 %). Estes teores de ácido indol acético produzem um efeito estimulador de raízes, onde ao ser translocado, por conjugação com açúcares, até a área basal da miniestaca aumentam a taxa de respiração e, com isso, ocorre a transformação dos carboidratos em compostos nitrogenados orgânicos (FERRI, 1997). Portanto, quando o nível endógeno de auxinas é elevado, há maior porcentagem de enraizamento adventício (GASPAR *et al.*, 1988, citados por DUTRA *et al.*, 2002).

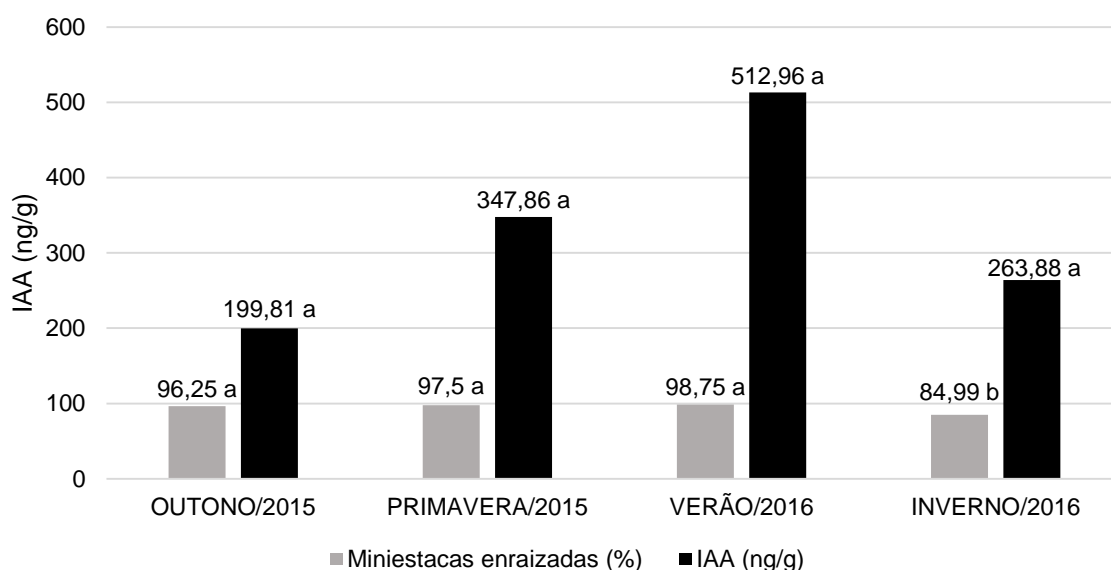


Figura 9: Porcentagem de enraizamento e teores de ácido indol acético (IAA) em miniestacas de *Eucalyptus camaldulensis* nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O aminoácido triptofano é comum em plantas, como constituinte das proteínas e precursor intermediário da biossíntese de várias substâncias endógenas, dentre elas o ácido indol acético (SCHNEIDER & WIGHTMAN, 1974; SHINGH, 1981; HAGGQUIST *et al.*, 1988; HARTMANN *et al.*, 2011), o qual reage com os fenóis (em condição de oxidação) formando a auxina endógena (GORDON & PALEG, 1961). As

plantas convertem triptofano em IAA através de várias rotas metabólicas. Tal conversão é importante para início do desenvolvimento e estabelecimento do eixo raiz-parte aérea das plantas (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Os compostos fenólicos, como ácido caféico e ácido clorogênico, interagem com as auxinas induzindo a iniciação de raízes. O composto catecol também reage com o IAA, sendo oxidado a uma quinona, e essa oxidação é o primeiro passo para a iniciação das raízes (BOUILLENNE & BOUILLENNE-WALRAND, 1955 citados por HARTMANN *et al.*, 2011).

A metodologia de extração de ácido indol acético utilizada nesta pesquisa foi inicialmente proposta por Kelen *et al.* (2004) em videira e rosa, onde observaram que os compostos hormonais estão presentes na forma não ionizada. Para estacas de eucalipto (*Corymbia torelliana* e *Corymbia citriodora*), observou-se que a concentração variou de 18 a 307 ng g⁻¹ de IAA assim como, de 3 a 64 ng g⁻¹ de ABA (WENDLING *et al.*, 2015).

Nos resultados obtidos de análise de correlação de Pearson, apresentados na Tabela 3, foi verificado existir correlação negativa significativa para os teores de açúcares totais, ou seja, quanto menor quantidade de açúcares totais presente na miniestaca maior será o enraizamento das miniestacas.

Tabela 3: Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis enraizamento, proteínas, açúcares totais e IAA para *Eucalyptus camaldulensis*.

	Enraizamento	Proteínas	Açúcares Totais	IAA
Enraizamento	1	0,38	-0,73**	0,35
Proteínas		1	-0,33	-0,22
Açúcares Totais			1	-0,36
IAA				1

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Resultados conflitantes foram observados por Felzener *et al.* (2007), onde verificaram que em estacas caulinares de *Poncirus trifoliata* o teor de açúcares totais foi maior no outono (8,09%), mesma estação onde o potencial de enraizamento foi maior observado, sugerindo existir correlação positiva entre o enraizamento e teor de açúcares. O aumento no teor de açúcares redutores e totais funcionou como fonte de carbono para a formação e crescimento das raízes nas estacas.

As demais variáveis não apresentaram correlação com o enraizamento das miniestacas, portanto não se pode comprovar ainda neste estudo se as proteínas e o ácido indol acético são imprescindíveis na indução de raízes adventícias. Os níveis endógenos de auxina são um fator crítico no processo de enraizamento bem-sucedido de muitas plantas (OSTERC *et al.*, 2009; OSTERC & STAMPAR, 2011, COSTA *et al.*, 2013), mas a falta de associação entre as concentrações de IAA e a capacidade de enraizamento em mudas de *C. torelliana* x *C. citriodora* concordam com os resultados de *Castanea sativa*, *Syringa vulgaris*, *Prunus persica*, *P. cerasus* x *P. canescens* e *E. globulus* (FORD *et al.*, 2002; TSIPOURIDIS *et al.*, 2006, NEGISHI *et al.*, 2014).

4.2 *Eucalyptus urograndis*

4.2.1 MINIESTAQUIA

As miniestacas de *E. urograndis* apresentaram um sistema radicial bem formado o período de 30 dias em casa de vegetação (Figura 10A), com características como raízes longas e finas (até 26,6 cm de comprimento), desenvolvimento de muitas raízes secundárias (Figura 10B), demonstrando uma melhor agregação ao substrato e adaptabilidade da muda ao sair da casa de vegetação e a presença de calos (Figura 10C).

A análise de variância para enraizamento e as demais variáveis de *E. urograndis* (Apêndice 3) demonstraram que não existe diferença estatística significativa entre o verão/2016 (97,50%) e outono/2015 (93,75%), caracterizando estas estações como as melhores épocas de coleta de propágulos para a espécie (Figura 11). As brotações coletadas no inverno não apresentaram sucesso no enraizamento, onde apenas 24,99% das miniestacas foram efetivamente enraizadas, enquanto o índice de sobrevivência foi de 36,66%, seguidos por miniestacas com calos de 35% (Tabela 4).

O potencial de enraizamento é muito afetado pela estação do ano, pelas práticas culturais e de manejo aplicadas durante o desenvolvimento das minicepas

por diversos fatores endógenos. Entretanto, não está exatamente claro o modo como estes fatores afetam o potencial de enraizamento e crescimento (KRUEGER & TRAPPE, 1967; CANNEL *et al.*, 1990; COLEMAN *et al.*, 1992).

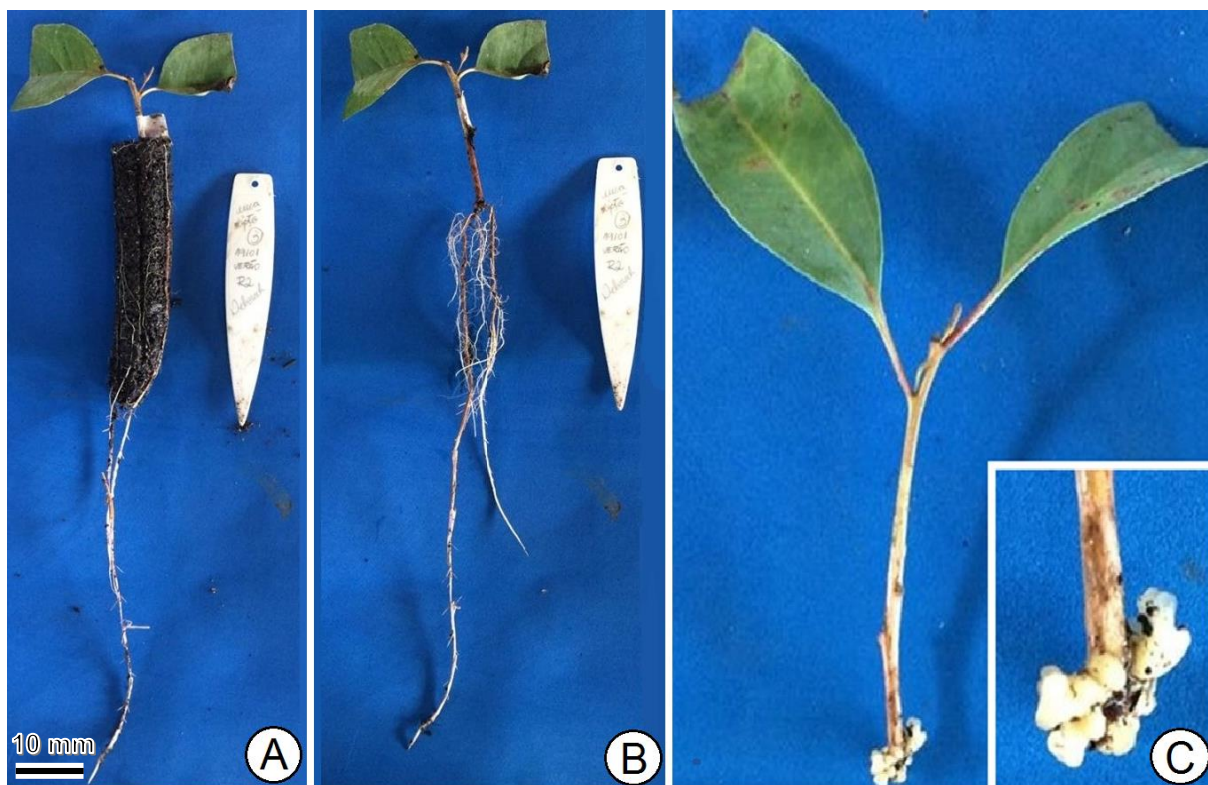


Figura 10: Miniestaca de *Eucalyptus urograndis* enraizada retirada do tubete e com substrato (A), miniestaca enraizada (B), miniestaca com calos e permanência do par de folhas iniciais (C), Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2016.

A influência da época do ano se dá, possivelmente, pelo fato de que as miniestacas coletadas no outono/2015 e inverno/2016 foram expostas a um período de crescimento vegetativo intenso, ocasionado pelas estações que antecedem (verão/2016 e primavera/2015) e, portanto, estão entrando em fase de reduzida atividade metabólica, o que, consequentemente, resulta na redução da formação de raízes adventícias (ALCANTARA *et al.*, 2007). Essa queda da porcentagem de enraizamento nas estações frias também foi constatada por Foster *et al.* (2000) com estacas de *Pinus taeda*, foram observados 50% de enraizamento em estacas coletadas na primavera e 20% nas colhidas no outono.

Freitas *et al.* (2009) observaram miniestacas de *E. urograndis* e verificaram que aos 21 dias 90% estavam enraizadas. Contudo, as miniestacas foram avaliadas

também aos 17 dias e já havia cerca de 80% de enraizamento, ou seja, a velocidade de enraizamento de *E. urograndis* é compatível com os valores observados nestes experimentos (78,75%; 93,75% e 97,50%), sendo assim constata-se como espécie de fácil enraizamento. Valores apresentados por Oliveira *et al.* (2012), a partir da miniestaquia dos híbridos *E. urophylla* x *E. globulus* e *E. grandis* x *E. globulus*, obtiveram apenas 65% das miniestacas enraizadas após 35 dias em casa de vegetação.

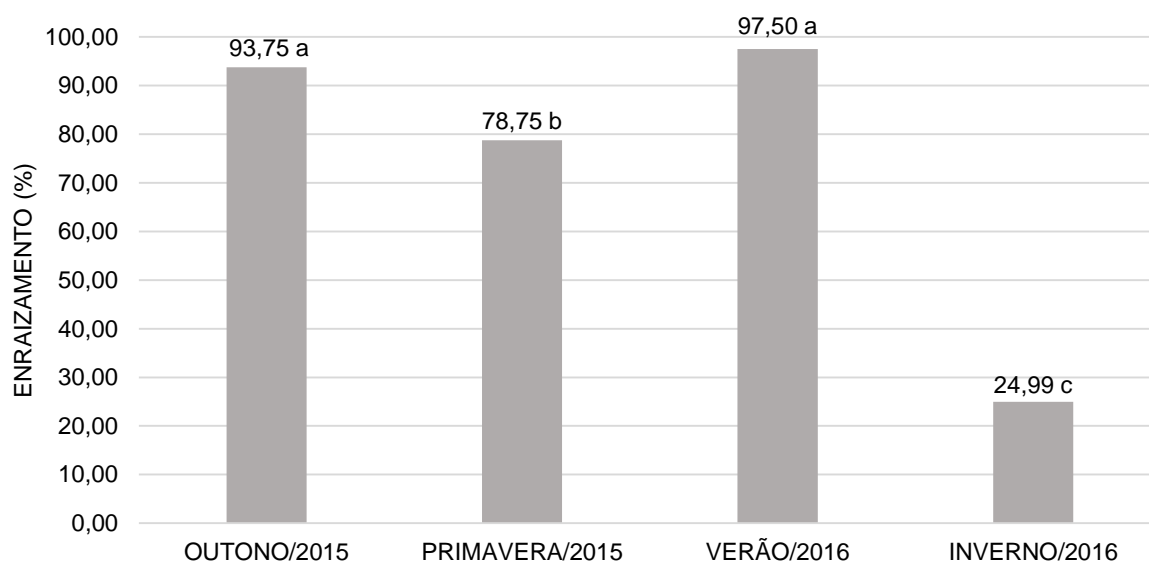


Figura 11: Porcentagem de enraizamento das miniestacas de *Eucalyptus urograndis* avaliadas nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

REIS *et al.* (2006) trabalhando com *E. urograndis* e *E. camaldulensis* apresentaram valores médios de 3,6 e 4,5 raízes por miniestaca. Para os mesmos clones os autores obtiveram comprimento das raízes a média de 7,60 cm.

O número de raízes por miniestaca não apresentou diferença estatística entre as épocas avaliadas, com média de 2,51 raízes (Tabela 4). O comprimento das três maiores raízes foi superior na estação verão (12,6 cm) e primavera (11,32 cm), não diferindo estatisticamente entre estas épocas, e a presença de calos foi observada com maior intensidade no inverno (35%). Porém, nas demais estações do ano, observou-se miniestacas enraizadas e com calos (Figura 12), ou seja, a formação do calo é uma etapa primordial para o enraizamento desta espécie.

Tabela 4: Porcentagem de miniestacas de *Eucalyptus urograndis* enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas, (MM), permanência do par de folhas (PF) e miniestacas brotadas (MB) a partir de material vegetal coletado em quatro épocas.

Épocas	ME	NR	CM	MC	MV	MM	PF	MB
OUTONO 2015	93,75 a	2,81 a	8,62 b	3,75 b	1,25 b	1,25 a	98,75 a	82,5 a
PRIMAVERA 2015	78,75 b	2,49 a	11,32 ab	3,75 b	5,00 b	12,5 a	63,75 b	86,25 a
VERÃO 2016	97,50 a	2,38 a	12,62 a	0,00 b	0,00 b	1,25 a	96,25 a	75,00 a
INVERNO 2016	24,99 c	2,36 a	0,54 c	35,0 a	36,66 a	3,33 a	25,00 c	88,33 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A época do ano está diretamente relacionada com a consistência do lenho, sendo que o material vegetal coletado no período de crescimento vegetativo (primavera e verão), possui maior capacidade de enraizamento, enquanto material coletado no inverno possui maior grau de lignificação, o que dificulta ainda mais o enraizamento das miniestacas (FACHINELLO *et al.*, 1994). Segundo Corrêa & Fett-Neto (2004), a temperatura ótima para o enraizamento adventício varia entre as espécies, sendo alta (25 a 30 °C) para espécies tropicais e baixa (15 a 20 °C) para subtropicais.

Quando as miniestacas são submetidas a condições de enraizamento, ocorre normalmente a formação de calos, por meio dos quais podem surgir raízes. Porém, a formação de raízes e calos é independente, e essa ocorrência simultânea é explicada pelo fato de ambos envolverem processos de divisão celular dependentes das condições internas da estaca (ALVARENGA & CARVALHO, 1983; HARTMANN *et al.*, 2011).

Zuffellato-Ribas & Rodrigues (2001) relataram a estação de inverno como a época mais favorável para a coleta de material vegetal, em jardim clonal de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, o qual apresentou 64% de enraizamento. Poggiani & Suiter Filho (1974) trabalhando com *E. grandis* obtiveram enraizamento de 31 a 81% em estacas avaliadas após 50 dias de permanência em casa de vegetação, as quais também apresentaram 31% de formação de calosidade.

Eucalyptus urograndis apresentou maior porcentagem de miniestacas vivas na estação do inverno (36,66%), mesma estação a qual foi observada menor porcentagem de enraizamento (25%). Na primavera foi verificada mortalidade de

12,5%, porém não diferindo estatisticamente das demais estações do ano (Apêndice 3).

Cunha *et al.* (2008) observaram 100% de sobrevivência das miniestacas de corticeira-do-mato, ou seja, não houve mortalidade, e em miniestacas provenientes de sistema semi-hidropônico observou-se 98% de miniestacas vivas.

Poggiani & Suiter Filho (1974) trabalhando com *E. grandis* obtiveram sobrevivência de 75% em estacas sem utilização de regulador vegetal, valor superior ao encontrado utilizando tratamento com 200 e 4000 mg L⁻¹ de ácido indol butírico, onde apresentaram 52% e 30% de sobrevivência respectivamente. Tagliani *et al.* (2010) obteve resultados satisfatórios utilizando miniestacas de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), onde a sobrevivência foi de 87% e a mortalidade de 12,5%.

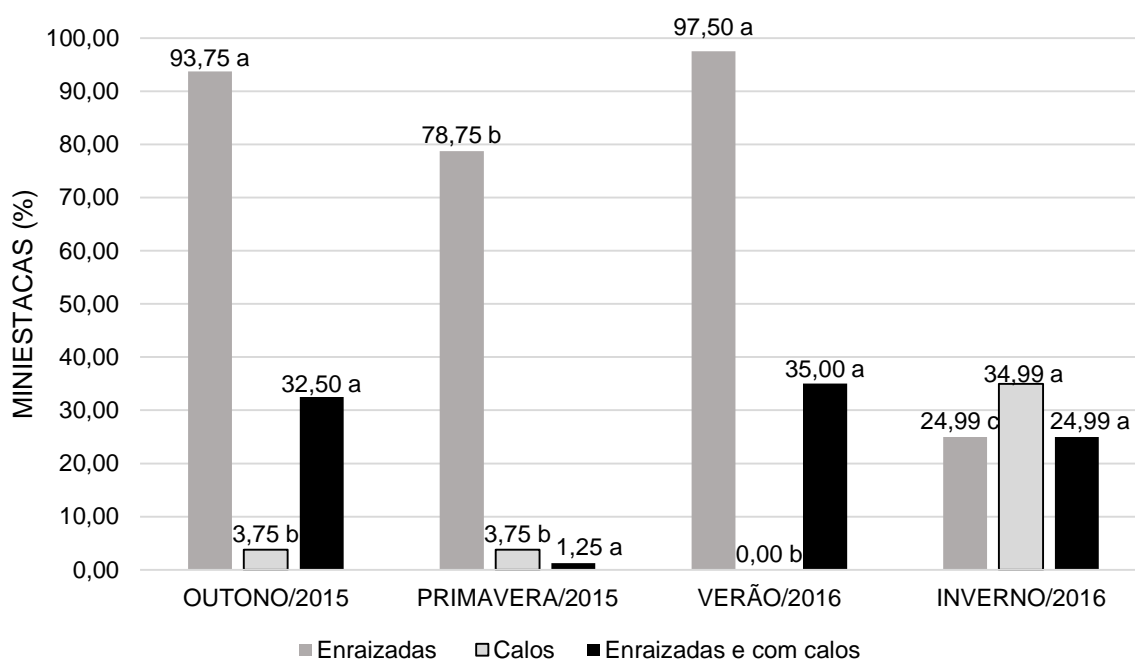


Figura 12: Porcentagem de miniestacas enraizadas, miniestacas com calos e miniestacas enraizadas e com calos de *Eucalyptus urograndis* nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Foi possível verificar na Tabela 4 que a permanência das folhas nas miniestacas de *E. urograndis* foi maior em material proveniente das estações de outono/2015 e verão/2016 (98% e 96% respectivamente), e no inverno/2016 foi

verificado a menor permanência de folhas (25%). O desenvolvimento de brotações não diferiu estatisticamente em todas as épocas de coleta, com valores acima de 75%.

Segundo Xavier *et al.* (2009), estacas herbáceas têm maior capacidade de formação de raízes, porém necessitam de maior controle das condições ambientais durante o enraizamento, para evitar a desidratação dos tecidos. Outro fato importante que pode estar relacionado às auxinas serem produzidas principalmente em regiões de crescimento ativo como primórdios foliares e folhas jovens (RAVEN *et al.*, 2007; HARTMANN *et al.*, 2011), fazendo com que miniestacas apicais tenham maiores níveis endógenos desse hormônio.

Entre algumas práticas utilizadas para maior sobrevivência e enraizamento das miniestacas, destacam-se o controle da temperatura e aumento da umidade. Estas condições buscam manter o vigor, turgescência e minimizam as atividades metabólicas das brotações, visando garantir o potencial máximo de enraizamento das miniestacas (XAVIER, 2002).

4.2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS MINIESTACAS

4.2.2.1 TEORES DE PROTEÍNAS E AÇÚCARES TOTAIS

Observou-se uma maior produção de proteínas e açúcares totais nas épocas de período de repouso (outono e inverno). O teor de proteínas totais foram maiores na estação outono/2015, com $8,38 \text{ g.100}^{-1}$ (Figura 13) e para os açúcares totais observou-se um destaque para o inverno/2016, com $657,72 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 14).

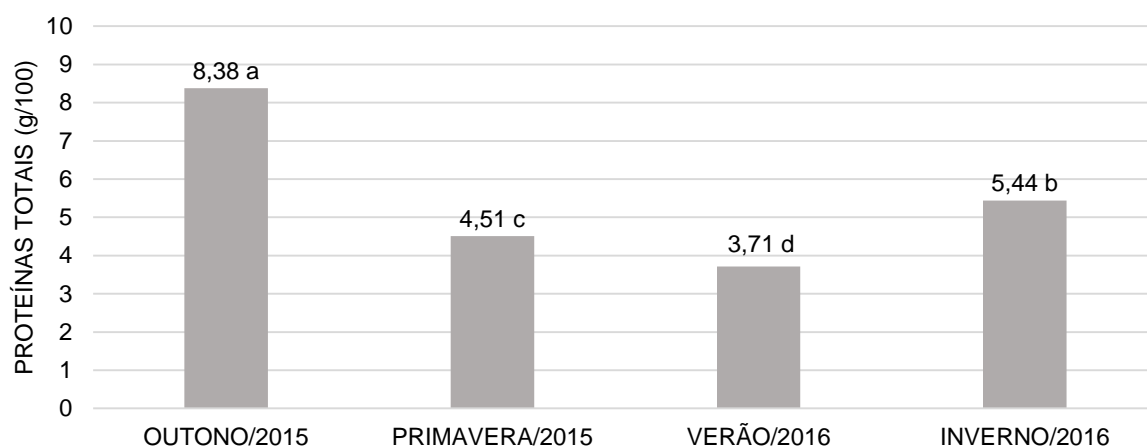


Figura 13: Teores de proteínas totais em base seca de miniestacas de *Eucalyptus urograndis* nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ono & Rodrigues (1996) relataram em seus trabalhos que o excesso de frutose ($C_6H_{12}O_6$) promove a inibição de sacarose-sintetase, o que reduz o efeito da sacarose em promover o enraizamento, sendo esta a base bioquímica para justificar a inibição do enraizamento causada pelo acúmulo de carboidratos em miniestacas. Segundo Rowe *et al.* (2002), as reservas mais abundantes de carboidratos são correlacionadas com maiores porcentagens de enraizamento. Com isso, a importância dos carboidratos é, praticamente, para a formação de raízes, pois a auxina exige uma fonte de carbono para a biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas, levando à necessidade de energia e carbono para formação de raízes (FACHINELLO *et al.*, 1995).

Os teores de açúcares aumentaram com o aumento da periodicidade de coleta. Tal fato provavelmente está relacionado com o aumento da área foliar uma vez que podas reduzem a área foliar e causam injúrias e, em resposta, os ferimentos mecânicos podem alterar a mobilização de carboidratos (TORRES, 2003).

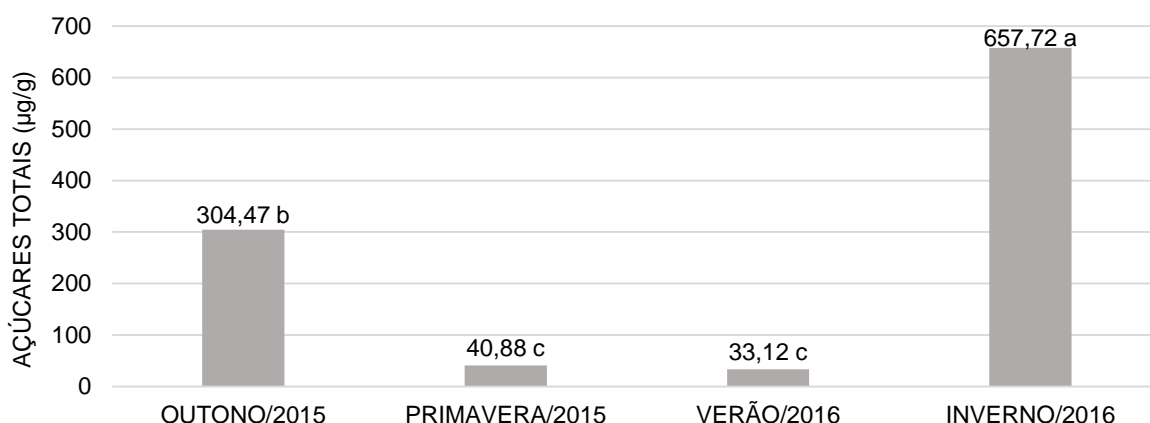


Figura 14: Teores de açúcares totais em base seca de miniestacas de *Eucalyptus urograndis* nas quatro estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Newell *et al.* (2002) avaliaram a variação sazonal na concentração de carboidratos não-estruturais em tecidos de galhos, troncos e raízes de quatro espécies tropicais (*Anacardium excelsum*, *Luehea seemannii*, *Cecropia longipes*, e *Urera caracasana*). A grande capacidade de produção fotossintética das folhas no começo da estação seca e o potencial de exportação de carboidratos de folhas senescentes pode explicar esse padrão. A combinação da elevada concentração de carboidratos não-estruturais (amido, pectina e açúcares) e a grande biomassa de galhos, troncos e raízes indicaram que as espécies estudadas estocaram e moveram grande quantidade de carboidratos.

Os passos limitantes para o transporte e acúmulo de assimilados nos tecidos drenos são o descarregamento do floema e a hidrólise da sacarose (WALKER *et al.*, 1978). A sacarose proveniente de tecidos fonte, ao chegar na região de utilização, será inicialmente hidrolisada em frutose e glicose podendo ser sintetizada novamente antes de ser utilizada em algum processo metabólico (GEROMEL *et al.*, 2005). Sung *et al.* (1989) sugerem que esses dois caminhos para a degradação da sacarose tenham funções diferentes durante o desenvolvimento da planta e são modulados como resposta à mudanças climáticas.

Isto pode ser comprovado por Dias *et al.* (2011) que obtiveram teores de açúcares totais em estacas de *Rubus* spp. coletadas no inverno antes e após o processo de enraizamento, apresentando valores de 43 µg.g⁻¹ e 24,6 µg.g⁻¹, respectivamente. Este aumento de açúcares na parte aérea indica que os carboidratos

atuam como fonte de fotoassimilados (açúcares solúveis), promovendo o enraizamento das estacas. Reis & Reis (1997) observaram uma correlação positiva das reservas de carboidratos quanto ao tempo para desenvolver brotações de *Populus tremuloides*.

Pode-se inferir que as reservas acumuladas ao longo do outono e inverno possam ter contribuído para o enraizamento avaliado nas estações subsequentes de *E. urograndis* (78,7% na primavera e 97,5% no verão). Apesar de haver um pico de proteínas e açúcares nas estações de outono e inverno, as plantas continuam acumulando reservas durante todo o ano, porém com menores teores.

4.2.2.2 TEORES DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (IAA)

O teor de ácido indol acético foi maior em brotações coletadas na estação do verão/2016 com 291,87 ng.g⁻¹, diferindo estatisticamente das demais estações do ano como pode ser observado na Figura 15. O potencial de enraizamento quando comparado aos valores de IAA quantificados demonstra relação bioquímica direta na emissão de raízes das miniestacas, onde as estações que obtiveram melhor enraizamento também apresentaram altos teores de auxina endógena na miniestaca. Apenas a estação de outono/2015 apresentou resultados conflitantes (potencial rizogênico de 93,7% com o menor teor de IAA de 103,9 ng.g⁻¹), com isso é indicado dar continuidade nos estudos entre épocas de coleta para observar estes dados.

Embora a auxina seja amplamente utilizada na indução do enraizamento, algumas investigações têm relatado o envolvimento de conteúdos fenólicos endógenos em relação à resposta de enraizamento (QADDOURY & AMSSA, 2004). De acordo com Gaspar & Hofinger (1988), há uma correlação positiva entre o nível de auxinas endógenas livres e a porcentagem de enraizamento. No entanto, não se pode atribuir as melhores respostas das variáveis obtidas no verão e outono unicamente à correlação IAA/enraizamento, pois conforme citado por Fachinello *et al.* (1994), a influência da época de coleta de propágulos no enraizamento pode também ser atribuída às condições climáticas, especialmente a temperatura.

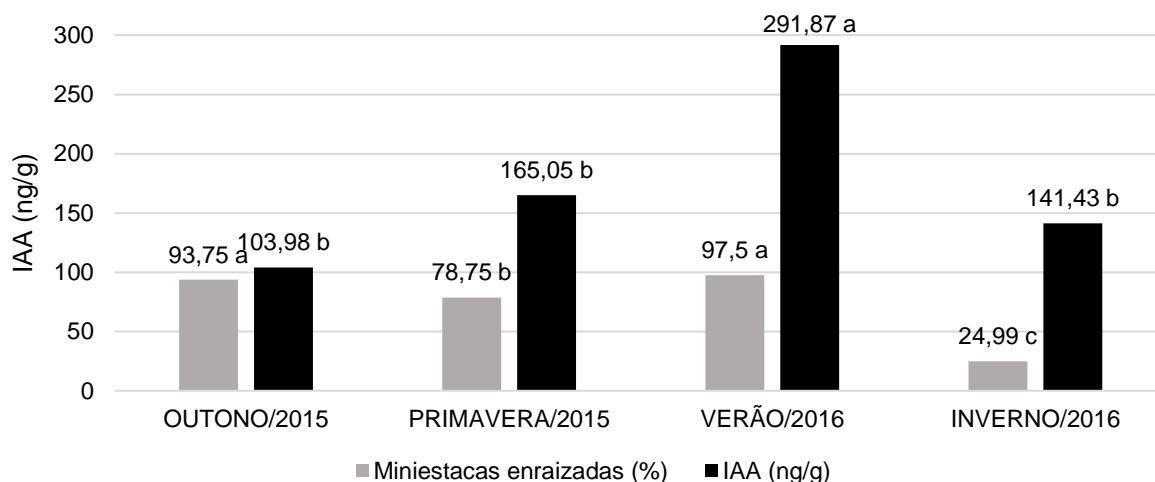


Figura 15: Porcentagem de enraizamento e teores de ácido indol acético (IAA) em miniestacas de *Eucalyptus urograndis* nas quatro estações no ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Kawaoka *et al.* (2010) citados por Borges *et al.* (2011) observaram clones de *Eucalyptus globulus* que apresentaram maiores taxas de enraizamento (90%) tinham três vezes mais IAA do que clones com baixo enraizamento (10%). O balanço interno dos hormônios vegetais pode apresentar alguns efeitos morfogênicos mais importantes, como o enraizamento adventício, do que o papel individual de cada hormônio (AREZKI, 2000).

Pelos resultados obtidos de análise de correlação de Pearson, apresentados na Tabela 5, foi verificado existir correlação negativa significativa entre açúcares totais e IAA, para as demais variáveis foram observados valores muito baixos. Ou seja, quanto maior for a quantidade de açúcares totais nas miniestacas menor será o potencial rizogênico, por se comportarem de modo inversamente proporcional, comprometendo o desenvolvimento fisiológico da espécie.

Tabela 5: Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis Enraizamento, Proteínas, Açúcares Totais e IAA para *Eucalyptus urograndis*.

	Enraizamento	Proteínas	Açúcares Totais	IAA
Enraizamento	1	0,11	-0,71	0,32
Proteínas		1	0,41	-0,76**
Açúcares Totais			1	-0,48
IAA				1

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Observou-se que, de modo geral, embora significativo em alguns casos, os valores de correlação encontrados foram baixos, em sua maioria. No entanto, baixos valores de correlação não implicam ausência de relação entre as variáveis analisadas. Dessa forma, os valores de correlação observados não são satisfatórios para explicar, com segurança, o comportamento das variáveis bioquímicas relacionadas ao sucesso do enraizamento de miniestacas.

4.3 *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni*

4.3.1 MINIESTAQUIA

As miniestacas de *E. benthamii* x *E. dunni* além de não apresentarem as características desejáveis para o desenvolvimento de uma boa muda (de 20 a 30 cm, sadia, boa quantidade de raízes primárias e secundárias e rústicas), demonstraram baixo potencial rizogênico e alto índice de mortalidade (Figura 16). A espécie pode ser observada em duas estações do ano, outono/2015 e primavera/2015, devido à ausência de material vegetal causado pela morte das minicepas utilizadas. A condição nutricional da planta matriz pode afetar seriamente o processo de formação de raízes principalmente no teor de carboidratos (NORBERTO, 1999).

O desempenho das mudas é importante para o sucesso de implantação de povoamento florestais, visto que o uso de mudas de melhor padrão de qualidade resulta no aumento da porcentagem de sobrevivência, das mesmas, após o plantio. Assim como diminui a frequência dos tratos culturais de manutenção do povoamento recém implantado garantindo um produto de boa qualidade e com menor custo (ALVES *et. al.*, 2005).



Figura 16: Miniestaca de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* enraizada e com calos (A), miniestacas com calos (B), miniestacas enraizadas com permanência do par de folhas iniciais (C), Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2016.

Não se sabe o que acarretou a morte das minicepas de *E. benthamii* x *E. dunni*, porém a espécie já demonstrava baixo potencial de enraizamento (22,5% na primavera). Isto pode ter ocorrido pois a porcentagem de enraizamento foi diretamente relacionada à idade fisiológica da planta matriz, pois quanto mais velhos os propágulos vegetais menor foi o enraizamento adventício da espécie. Segundo Bitencourt *et al.* (2009) isto se deu devido a deficiência de promotores e excesso de inibidores do enraizamento no material proveniente de plantas adultas, justificado pela baixa porcentagem de enraizamento, nutrição, condições de enraizamento e condições do ambiente.

Graça *et al.* (1999) obtiveram resultados de estaquia para *E. benthamii* x *E. dunni*, onde no outono o enraizamento médio foi de 26,3%, com um máximo de 30%

por planta matriz. Na primavera, a média de enraizamento foi de 31,2%, com o máximo de 33,3%.

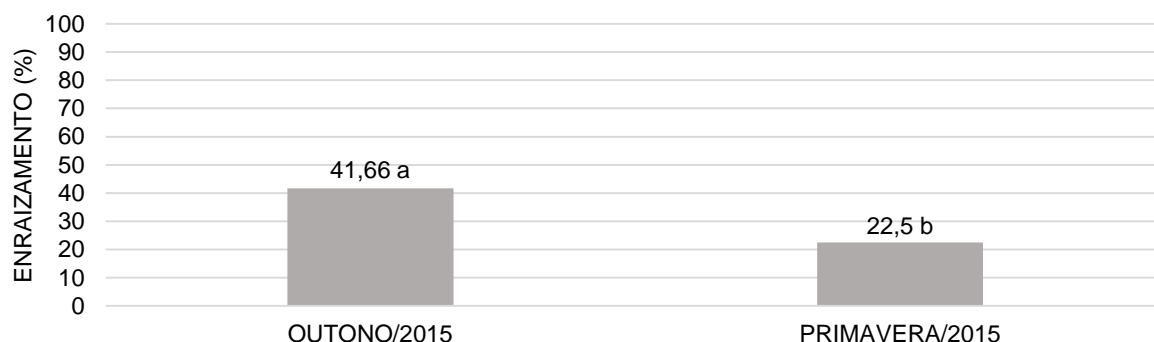


Figura 17: Porcentagem de enraizamento das miniestacas do *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* em duas épocas do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Brondani *et al.* (2010) obtiveram melhores índices de enraizamento de *E. benthamii* x *E. dunni* na estação de outono e inverno, com valores de 40% e 70%. Resultados semelhantes foram observados por Brondani *et al.* (2010b), onde o enraizamento máximo para o mesmo clone foi de 55% mesmo utilizando concentrações de 2000 a 8000 mg L⁻¹ de ácido indol butírico.

Os resultados de enraizamento de *E. benthamii* x *E. dunni* corroboram parcialmente aos encontrados por Kratz *et al.* (2012), onde utilizando as mesmas minicepas deste trabalho para coleta de propágulos obtiveram porcentagem de enraizamento de 29% a 52%. Brondani *et al.* (2014) consideram *E. benthamii* como espécie de difícil enraizamento, devido ao potencial de 43,5% de indução radicial observado.

Segundo Assis e Mafia (2007) as espécies que compõem o híbrido *E. benthamii* x *E. dunni* possuem histórico de recalcitrância ao enraizamento, característico de espécies subtropicais, o que dificulta o uso destes materiais genéticos em programas clonais visando à resistência ao frio, pois são desconhecidas as condições ambientais envolvidas, bem como a fisiologia de enraizamento dessas espécies.

Tabela 6: Porcentagem de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas, (MM), permanência do par de folhas (PF) e miniestacas brotadas (MB) a partir de material vegetal coletado em duas épocas.

	ME	NR	CM	MC	MV	MM	PF	MB
OUTONO 2015	41,66 a	2,11 a	1,97 a	14,99 a	9,99 a	33,33 a	38,33 a	39,99 a
PRIMAVERA 2015	22,50 b	2,60 a	0,22 b	21,25 a	10,00 a	46,25 a	25,00 a	12,50 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O outono apresentou maior porcentagem de enraizamento (41,6%) seguido da primavera com 22,5% (Apêndice 5). Não houve diferença estatística das variáveis número de raízes por miniestaca e miniestacas com calos (Tabela 6).

Na estação da primavera 21,25% das miniestacas estavam enraizadas e com calos (Figura 18). Apesar da incidência de calos na primavera, ainda não se pode afirmar se *E. benthamii* x *E. dunni* é dependente da formação de calos como etapa inicial do enraizamento.

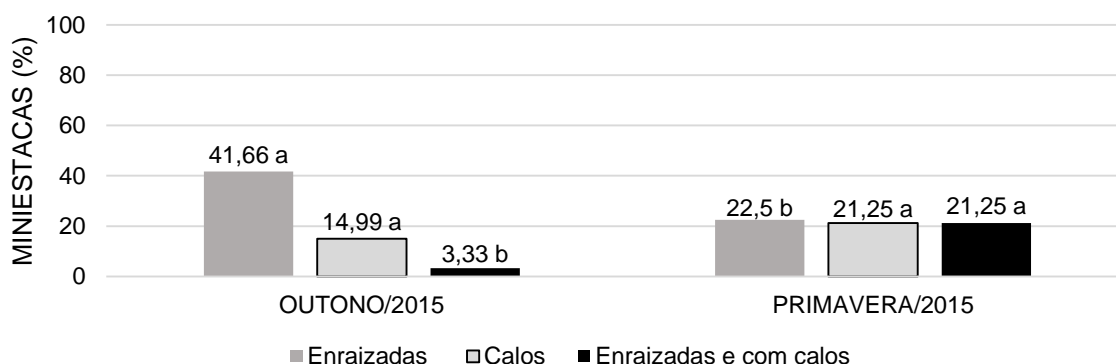


Figura 18: Porcentagem de miniestacas enraizadas, miniestacas com calos e miniestacas enraizadas e com calos de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* em duas estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O calo é um tecido cicatricial podendo surgir do cambio vascular, córtex e da medula cuja formação representa o início do processo de regeneração (FACHINELLO *et al.*, 2005). Faganello (2012) observou que a auxina promoveu aumento de calos em miniestaquia de *Cordia trichotoma* resultante da ativação de células até um ponto

máximo e então inibiu, afirmando que os processos de formação de calos e raízes são independentes, podendo ou não se diferenciar em primórdios radiculares.

E. benthamii x *E. dunni* apresentou mortalidade de 46% na primavera, sem haver diferença estatística em relação ao outono (Apêndice 5). Estes valores condizem com o estágio fisiológico que a minicepa foi apresentada no decorrer do ano, não respondendo com bons resultados do enraizamento e produzindo pouquíssimas brotações. De modo geral, eucalipto enraiza muito bem na idade jovem; porém, com o passar do tempo, acumulam-se inibidores do enraizamento, que praticamente impedem o enraizamento de propágulos coletados de minicepas no estágio adulto, ou seja, de maneira geral, quanto mais velha a árvore ou material selecionado, menor a porcentagem de enraizamento (BRUNE, 1982).

Ferriani *et al.* (2011) obtiveram resultados similares utilizando miniestacas de *Piptocarpha angustifolia*, onde a porcentagem média de miniestacas mortas foi maior nas estações do inverno (50%) e primavera (42,5%), seguida pelo outono (20%). Resultados estes que diferem completamente aos obtidos por Brondani *et al.* (2010), onde a sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* obteve valores médios melhores durante o inverno, em que os índices mantiveram-se próximos a 100%.

Para a variável miniestacas brotadas, *E. benthamii* x *E. dunni* apresentou diferença estatística onde o outono apresentou maiores índices (39,99%). Já para permanência de folhas não houve diferença estatística entre as duas estações estudadas.

Moraes *et al.* (2014) avaliaram a influência das folhas no enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus*, e observaram que as miniestacas deixadas com dois pares e um par de folhas inteiras apresentaram maiores índices de enraizamento (97%) e de massa seca de raiz (0,07 g/planta). Segundo os mesmos autores, ao utilizar folhas inteiras pode-se obter resultados significativos quanto ao aumento do enraizamento.

4.3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS MINIESTACAS

4.3.2.1 TEORES DE PROTEÍNAS E AÇÚCARES TOTAIS

Os teores de proteínas totais de *E. benthamii* x *E. dunni* foram maiores tanto em relação as duas estações comparadas, bem como quando se compara entre os clones de *Eucalyptus* estudados. Miniestacas coletadas no outono apresentaram alto teor de proteínas totais ($11,54 \text{ g} \cdot 100^{-1}$), diferindo estatisticamente da estação primavera (Apêndice 6). A grande queda dos teores de proteínas, da estação do outono para a primavera, se dá pelo gasto energético da miniestaca em transportar para a área basal e produzir com eficiência um novo sistema radicial (Figura 19). Mais estudos devem ser realizados sobre este clone, pois este alto teor de proteínas pode ser muito útil na alimentação animal.

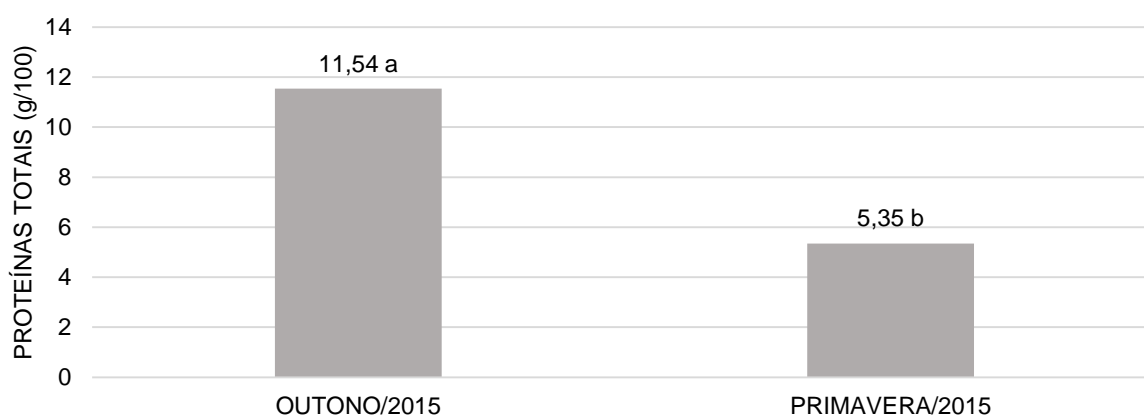


Figura 19: Teores de proteínas totais em base seca de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* em duas estações do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A análise de açúcares totais foi realizada apenas na estação da primavera, onde apresentou resultado de $10,69 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, o qual não pode ser calculado na base seca devido à ausência de material para análise de umidade (Figura 20). Aparentemente, existe relação entre os altos teores de açúcares e a maior capacidade de formação de raízes, pois estacas de ramos coletados no outono apresentaram maior teor de açúcares e maior enraizamento (ONO *et al.*, 1998). Para a estação

outono/2015 não foi realizada a análise de açúcares totais devido à ausência de material vegetal.

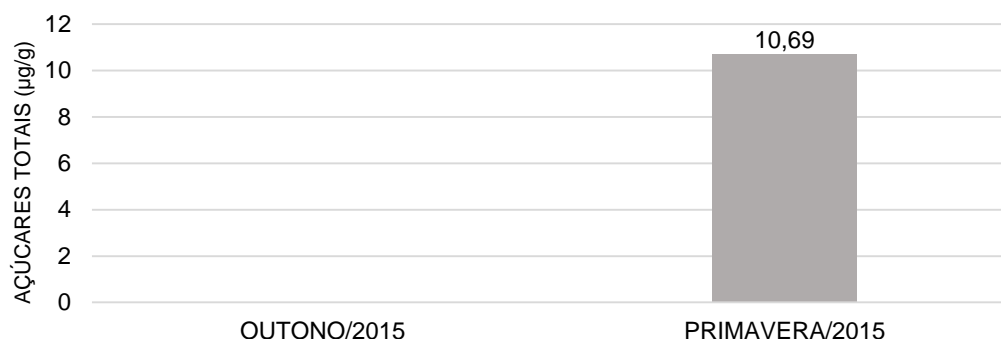


Figura 20: Teores de açúcares totais em miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* em duas estações do ano.

A iniciação de raízes, crescimento, desenvolvimento e sobrevivência de mudas jovens são processos que demandam energia e o manejo fisiológico para aumentar os carboidratos na planta muitas vezes faz-se necessário. Em condições de viveiro, onde a planta ainda está sendo formada, as folhas são a principal fonte de produção de fotoassimilados, açúcares e hormônios, portanto, a mobilização de carboidratos das raízes para parte aérea é pouco provável (TORRES, 2003).

Segundo Hackett (1988), a habilidade de enraizamento de espécies lenhosas declinam com a maturidade e isso ocorre porque há significativas alterações na capacidade morfogênica dos tecidos quando as espécies lenhosas passam do estado juvenil para o estado adulto.

4.3.2.2 TEORES DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (IAA)

Pode-se observar que a concentração de IAA foi maior nas duas estações estudadas para *E. benthamii* x *E. dunni*, ao ser comparada com as outras espécies da pesquisa (*E. camaldulensis* e *E. urograndis*), apresentando valores constantes que não se diferem estatisticamente entre o outono/2015 e primavera/2016 (Apêndice 6).

Os altos teores de IAA quantificados (243,35 ng.g⁻¹ e 226,37 ng.g⁻¹) não proporcionaram um bom enraizamento para a espécie, portanto conclui-se que *E.*

benthamii x *E. dunni* se enquadraram como espécie de difícil enraizamento, onde mesmo com altos teores de ácido indol acético endógeno a minicepa e suas brotações apresentam potencial rizogênico muito baixo (22,5% a 41,6%). Portanto, estima-se que mais estudos devem ser realizados em função do enraizamento nas demais estações do ano.

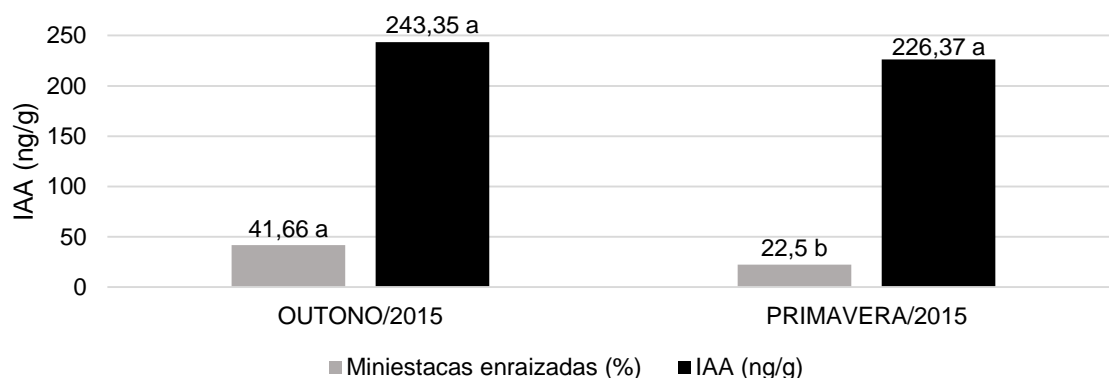


Figura 21: Porcentagem de enraizamento e teores de ácido indol acético em miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* em duas épocas do ano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Conforme correlação de Pearson (Tabela 7), esta espécie mesmo apresentando alto grau de correlação de IAA não foi suficiente para o sucesso do enraizamento. Os demais coeficientes apresentaram coeficientes de baixo a nulo, sem nenhuma interação.

Tabela 7: Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis enraizamento, proteínas, açúcares totais e IAA para *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni*.

	Enraizamento	Proteínas	IAA
Enraizamento	1	0,51	0,81
Proteínas		1	0,18
IAA			1

Foi realizada também a análise de correlação de Pearson com todos os valores avaliados das três espécies estudadas. Pelos resultados obtidos e apresentados na Tabela 8, foi verificado existir correlação negativa significativa entre proteínas e açúcares totais com o enraizamento. Portanto, os teores de proteínas e açúcares não

influenciam de forma efetiva no enraizamento, ou seja, é necessário a participação de outros compostos presentes na miniestaca para que haja efeito em conjunto na diferenciação e emissão de raízes.

Tabela 8: Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis enraizamento, proteínas, açúcares totais e IAA para *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus urograndis* e *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* avaliados em quatro estações do ano.

	Enraizamento	Proteínas	Açúcares Totais	IAA
Enraizamento	1	-0,44**	-0,71**	0,27
Proteínas		1	0,26	-0,30
Açúcares Totais			1	-0,40*
IAA				1

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

5 CONCLUSÃO

Nas condições em que foram desenvolvidos os experimentos, foi possível concluir:

Eucalyptus camaldulensis

1. Apresentou maior porcentagem de enraizamento nas estações verão, primavera e outono;
2. Apresentou altos índices de miniestacas com calos e mesmo assim emitiram raízes, ou seja, a rizogênese é indireta;
3. Teores de açúcares totais não influenciaram no enraizamento;
4. Teores de proteínas totais no outono influenciaram o enraizamento nas estações quentes;
5. Os teores de IAA livre não diferiram entre as estações e mesmo assim obtiveram elevado potencial de enraizamento.

Eucalyptus urograndis

1. Apresentou maior porcentagem de enraizamento nas estações verão e outono;
2. Apresentou altos índices de miniestacas com calos e mesmo assim emitiram raízes, ou seja, a rizogênese é indireta;
3. Teores de açúcares totais não influenciaram no enraizamento;
4. Teores de proteínas totais no outono influenciaram o enraizamento;
5. Teores de IAA livre foram maiores na estação verão, apresentando o melhor índice de enraizamento

***Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*:**

1. Espécie de difícil enraizamento;
2. Teor de proteínas totais foi maior no outono;
3. Teor de IAA livre alto nas duas estações, obtendo correlação positiva com enraizamento;
4. Recomenda-se repetir os experimentos de enraizamento e os estudos para análise de quantificação de IAA e nas demais estações do ano.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Figura 22A apresenta uma síntese das médias gerais obtidas para a comparação do potencial de enraizamento das três espécies de *Eucalyptus* nas quatro estações do ano estudadas. De maneira geral, verificou-se o menor potencial de enraizamento em miniestacas coletadas no inverno tanto para *E. camaldulensis* como *E. urograndis*. Nas demais estações foi verificado enraizamento acima de 90%, apresentando maior potencial rizogênico (99%) na estação verão. Para *E. benthamii* x *E. dunni* o enraizamento foi maior em propágulos coletados no outono (41%).

Esses valores são resultados satisfatórios no que se refere à recomendação desta forma de propagação vegetativa, visando a produção de mudas. Com base no potencial de enraizamento de *E. camaldulensis* e *E. urograndis*, podem ser caracterizadas como espécies de fácil enraizamento.

Nas estações do outono para *E. camaldulensis* e verão para *E. urograndis* não foi observada a presença significativa de miniestacas com calos (miniestacas vivas, com formação de massa celular indiferenciada na base sem a presença de raízes). No restante das estações a formação de calos foi observada em grande porcentagem das miniestacas, não afetando o enraizamento das mesmas.

O maior teor de ácido indol acético quantificado (IAA livre), observado na Figura 22B, foi maior para *E. camaldulensis*, o qual apresentou teores iguais estatisticamente durante o decorrer das estações. Este teor de IAA vem sendo considerado um dos mais efetivos na promoção do sistema radicial devido ao melhor aproveitamento de auxinas endógenas, assim como de açúcares, proteínas, compostos fenólicos da miniestaca.

De modo geral, a quantificação de IAA foi maior em miniestacas coletadas na estação de verão e primavera, porém não se diferem estatisticamente das demais épocas de coleta. Os dados obtidos nestes experimentos apontam um melhor desempenho para *E. camaldulensis* em qualquer época de coleta, proveniente de minicepas em minijardim.

Apesar das miniestacas de *Eucalyptus* apresentarem um pico de açúcares totais (Figura 22C) e proteínas (Figura 22D) no outono e inverno, as minicepas continuam produzindo e acumulando substâncias de reserva nas estações frias,

porém em menores proporções. Pode-se observar que estas substâncias determinadas em todas as estações do ano apresentam-se de forma semelhante no outono e inverno, onde verificam-se a existência de um consumo energético essencial para o enraizamento das miniestacas.

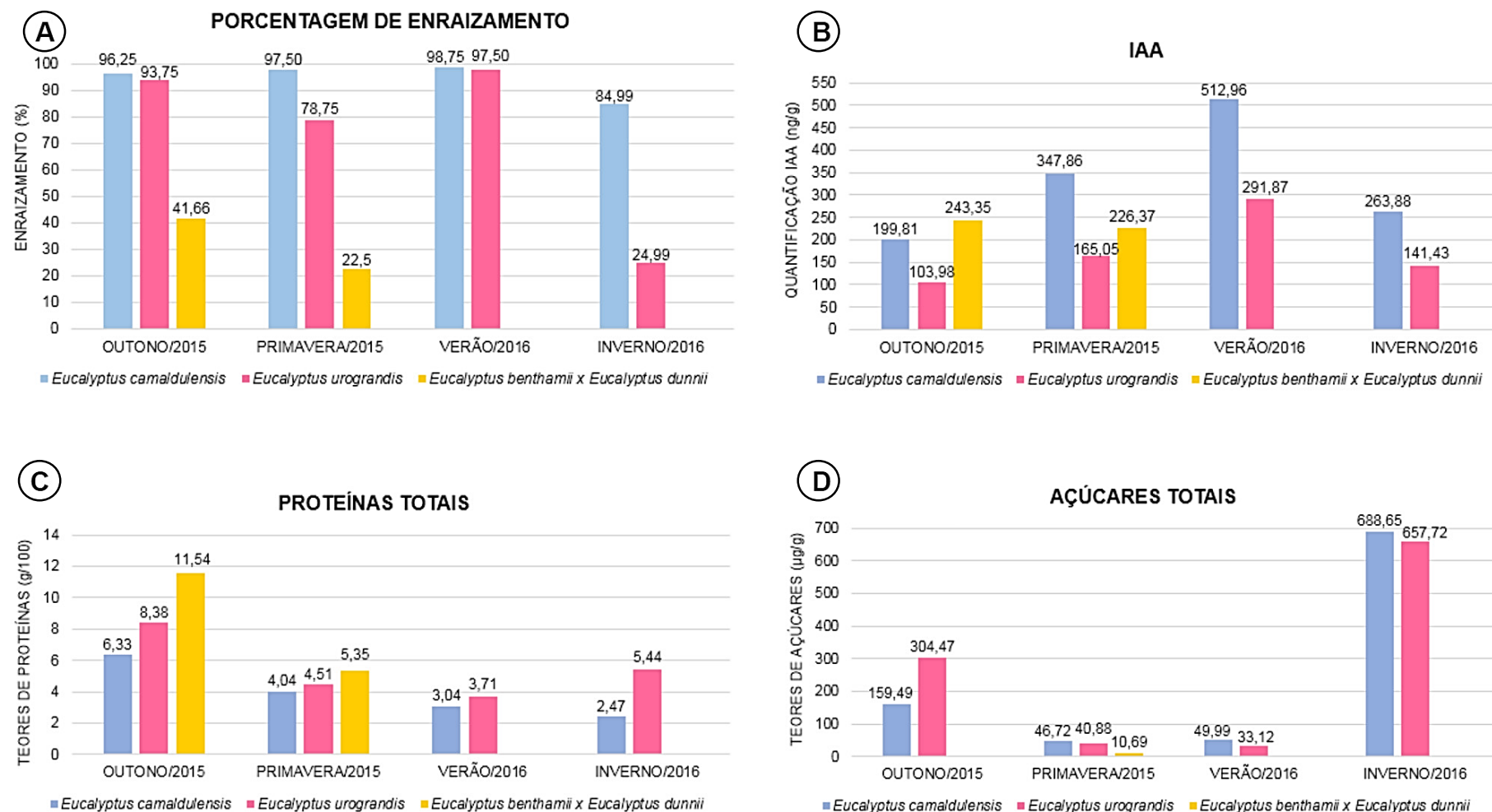


Figura 22: Comparação de médias entre os clones de *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus urograndis*, *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* das variáveis porcentagem de enraizamento (A), quantificação de IAA (B), teores de proteínas totais na base seca (C) e os teores de açúcares totais na base seca (D). Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2016.

REFERÊNCIAS

ABRAF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2012. Brasília, 2013.

ALCANTARA, G. B de; RIBAS, L. L. F.; HIGA, A. R.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S. Efeito da idade da muda e da estação do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.3, p.399-404, 2007.

ALCANTARA, G. B.; RIBAS, L. L. F.; HIGA, A. R.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Efeitos do ácido indolbutírico (AIB) e da coleta de brotações em diferentes estações do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L., **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 36, n. 78, p. 151-156, 2008.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, Editora UFV, 2004, 442 p.

ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M.; PAIVA, H. N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.

ALTMAN, A.; WAREING, P.F. The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of ^{14}C -labelled assimilates in relation to root formation in *Phaseolus vulgaris* cuttings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.33, p.32-8, 1975.

ALVARENGA, M. L. R.; CARVALHO, V. D. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de estacas frutíferas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, n. 101, p. 47-55, 1983.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update 4 of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.161, n. 2, p. 105-21, out. 2009.

AREZKI, O. Hormonal control of proliferation in meristematic agglomerates of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 36, n. 5, p. 398-401, 2000.

ARTECA, R. N. **Plant Growth Substances**: Principles and application. New York: Chapman and Hall, 332 p., 1995.

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings**. EMBRAPA, Colombo – PR, p. 300- 304, 1997.

ASSIS, T. F. de; MAFIA, R. G. **Hibridação e clonagem**. In: BORÉM, A. (Ed.). Biotecnologia Florestal. Viçosa, MG: UFV, 2007, p. 93-121.

BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; LANI, E. R. G. Aclimatização ex vitro de plantas propagadas pela enxertia in vitro de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 31, n. 5, 2007.

BENSON, D.; McDOUGALL, L. Ecology of Sydney plant species: part 6 dicotyledon family Myrtaceae. **Cunninghamia**, Sydney, v. 5, n. 4, p. 809-987, 1998.

BIASI, L. A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 455-459, 2003.

BITENCOURT, J. **Propagação vegetativa de *Ginkgo biloba* L. (GINKGOACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Paraná, 95 p., 2006.

BITENCOURT, J.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 3, Botucatu, 2009.

BOLAND, D. J.; BROOKER, M. I. H.; CHIPPENDALE, G. M.; HALL, N.; HYLAND, B. P. M.; JOHNSTON, R. D.; KLEINIG, D. A.; TURNER, J. D. **Forest trees of Australia**. Melbourne: Nelson; CSIRO, 687 p., 1984.

BOOTH, T. H.; NIX, H. A.; HUTCHINSON, M. F.; JOVANOVIC, T. Niche analysis and tree species introduction. **Forest Ecology and Management**. Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 47-59, 1988.

BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S. de; MELO, L. A. de; ROSADO, A. M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.3, p.425-434, 2011.

BORTOLINI, M. F. **Uso de ácido indol butírico na estaquia de *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn.** 2006, 73f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2006.

BRAGA J. L. P. **Estabilidade fenotípica de clone de *Eucalyptus urograndis*, na Fazenda Bom Jardim - Aparecida - SP.** 2008. 16 p. Monografia (Graduação em

Engenharia Florestal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. Instituto Adolf Lutz, 4ª Edição, p. 122-125, Brasília, 2005, 1018 p.

BREEN, P.J.; MURAOKA, T. Effect of indolbutyric acid on distribution of ^{14}C -photosynthate in softwood cuttings on Matiana 2624 Plum. **Journal of the American Society Horticulture**, Alexandria, v.42, p.153-155, 1985.

BRIGATTI, R. A. M., SILVA, A.P., FREITAS, M. **Estudo comparativo do comportamento de alguns híbridos de *Eucalyptus***. Circular Técnica, Piracicaba, n.123. 1980.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, M. A. miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*: (II) sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 3, p. 453-465, Santa Maria – RS, 2010a.

BRONDANI, G. E.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, M. A. Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Acta Scientiarum**, Maringá – PR, v. 32, n. 4, p. 667-674, 2010b.

BRONDANI, G. E.; BACCARIN, F. J. B.; BERGONCI, T.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. de. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii*: efeito do genótipo, AIB, zinco, boro e coletas de brotações. **Revista Cerne**, v. 20, n. 1, Lavras, 2014.

BRUNE, A. Estratégia da multiplicação vegetativa no melhoramento florestal. **Revista Árvore**, v. 6, n. 2, p. 162-165, 1982.

BUTCHER, P. A.; SKINNER, A. K.; GARDINER, C. A. Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii*. **Conservation Genetics**, v. 6, n. 2, p. 213-226, 2005.

CANNELL, M. G. R.; TABBUSH, P. M.; DEANS, J. D.; HOLLINGSWORTH, M. K.; SHEPPARD, L. J.; PHILLIPSON, J. J.; MURRAY, M. B. Sitka spruce and Douglasfir seedlings in the nursery and in cold storage: root growth potential, carbohydrate content, dormancy, frost hardiness and mitotic index. **Forestry**, v.63, p.9-27, 1990.

CAMPINHOS JÚNIOR, E. Propagación vegetativa de *Eucalyptus* spp. por enraizamento de estacas. In: SIMPOSIO SOBRE SILVICULTURA Y

MEJORAMIENTO GENETICO DE ESPECIES FORESTALES, Buenos Aires, 1987. **Anais**. Buenos Aires: CIEF, 1987. v.1, p.208-214.

CARON, B. O.; SOUZA, V. Q.; ELOY, E.; BEHLING, A.; SCHMIDT, D.; TREVISAN, R. Resistência inicial de quatro espécies arbóreas em diferentes espaçamentos após ocorrência de geada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p.817-822, 2011.

CARVALHO, A. M. **Valorização da madeira do híbrido *Eucalyptus grandis* x *urophylla* através da produção conjunta de madeira serrada em pequenas dimensões, celulose e lenha**. Piracicaba, 2000. 128p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo.

CARVALHO, R. I. N. de; SILVA, I. D. da; FAQUIM, R. Enraizamento de miniestacas herbáceas de maracujazeiro amarelo. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina – PR, v. 28, n. 3, p. 387-392, 2007.

COLEMAN, W.K.; ESTABROOKS, E.N., O'HARA, M.; EMBLETON J.; KING, R. Seasonal changes in cold hardiness, sucrose and sorbitol in apple trees treated with plant growth regulators. **Journal of Horticultural Science**, 67, p.429-435, 1992.

CORRÊA, L.R.; FETT-NETO, A.G. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Thermal Biology**, Durham, v. 29, n. 6, p. 315-324, 2004.

COSTA, C. T.; ALMEIDA, M. R. de; RUEDELL, C. M.; SCHWAMBACH, J.; MARASCHIN, F. S.; FETT-NETO, A.G. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1–19, 2013.

COUVILLON, G. A. Rooting responses to different treatments. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 227, p. 187-196, 1988.

CRANSWICK, A. M.; ROOK, D. A.; ZABKIEWICZ, J. A. Seasonal changes in carbohydrate concentration and composition of different tissue types of *Pinus radiata* trees. **New Zeland Journal of Forestry Science**, v.17, n.2/3, p.229-245, 1987.

CUNHA, A. C. M. C. M. da; WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Miniestaquia em sistema de hidroponia e em tubetes de corticeira-do-mato. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 18, n. 1, p. 85-92, 2008.

DAVIS, T.D.; POTTER, I. Current photosynthate as a limiting factor in adventitious root formation on leafy pea cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.106, p.278-282, 1981.

DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E., **Biology of Adventitious Root Formation**. Plenum Press, 1994, New York.

DIAS, J. P. T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. IBA e carboidratos no enraizamento de brotações procedentes de estacas radiciais de *Rubus* spp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, volume especial, p. 666-671, 2011.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S. de; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-462, Colombo – PR, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH F. **Colorimetric method for determination of sugar and related substances**. Analytical Chemistry v. 28, p. 350-356, 1956.

DUTRA, L. F.; KERSTEN, E.; FACHINELLO, J. C. Época de coleta, ácido indolbutírico e triptofano no enraizamento de estacas de pessegueiro. **Scientia Agricola**, v.59, n. 2, p.327-333, 2002.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. **Eucalyptus domestication and breeding**. New York: Oxford University Press, 1994.

EPSTEIN, E.; LAVEE, S. Conversion of IBA to IAA by cuttings of grapevine and olive. **Plant Physiology**, Bethesda, v.72, p.1 16, 1983.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPEL, 1994. 179p.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: Editora Universitária, 1995. 178p.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. **Propagação vegetativa por estaquia**. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN A.; NACHTIGAL J. C. Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 69-109, 2005.

FAGANELLO, L. R. **Propagação vegetativa de miniestacas de *Cordia trichottoma* em função de auxinas e épocas de coleta**. 2012, Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon – PR.

FARIA, J. R.; SILVA, J. F.; NERIS, K. P.; LOPES, F. L. R.; SILVA, M. C.; RODRIGUES, J.; CENTENO, A. J.; LOPES, F. M. Desenvolvimento de *Eucalyptus urograndis* no município de Corumbá – GO. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 2, p. 9-27, 2013.

FELZENER, L. T.; BARREIRO, A. P.; ONO, E. O.; BARROS-CARDOSO, S. A. de; RODRIGUES, J. D. Efeitos de reguladores vegetais no enraizamento de estacas caulinares de *Poncirus trifoliata* var. monstrosa (T. Ito). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, 2007.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Embrapa Florestas, Documentos 94, Colombo – PR, 2004.

FERREIRA, C. A.; SILVA, H. D. da. ***Eucalyptus* para a Região Amazônica, Estados de Rondônia e Acre**. Comunicado Técnico 116. Embrapa Florestas, Colombo – PR, 2004.

FERREIRA, M. **Escolha de Espécies de Eucalipto**. Circular Técnica IPEF, v. 47, p. 1-30, 1979.

FERRI, C.P. Enraizamento de estacas de citrus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.19, n.1, p.113-121, 1997.

FERRIANI, A. P.; BORTOLINI, M. F.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S. Propagação vegetativa de estaquia de azaléia arbórea (*Rhododendron Thomsonii* HOOK. f.). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina – PR, v. 27, n. 1, p. 35-42, 2006.

FERRIANI, A. P. 100f. **Estaquia de vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia* Dusén) com uso de ácido indol butírico**. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. **Miniestaquia aplicada a espécies florestais**. *Revista Agro@mbiente*, v. 4, n. 2, p. 102-109, 2010.

FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; HELM, C. V.; BOZA, A.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S. Produção de brotações e enraizamento de miniestacas de *Piptocarpha angustifolia*. **Pesquisa Floresta Brasileira**, v. 31, n. 67, p. 257-264, 2011.

FREITAS, T. A. S. de; BARROSO, D. G.; MENDONÇA, A. V. R.; CARNEIRO, J. G. de A.; PENCHEL, R. M. Manejo de miniestacas de eucalipto no setor de enraizamento para a produção em sistema de blocos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 483-490, 2009.

FOELKEL, C. **As plantações de florestas no Brasil**. In: BORÉM, A. (Ed.). Biotecnologia florestal. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 13-24.

FORD, Y. Y.; BONHAM, E. C.; CAMERON, R. W. F.; BLAKE, P. S.; JUDD, H. L.; HARRISON-MURRAY, R. S. Adventitious rooting: examining the role of auxin in an easy-and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, v. 36, p.149–159, 2002.

FOSTER, G. S.; STELZER, H. E.; MCRAE, J. B. Loblolly pine cutting morphological traits: effects on rooting and field performance. **New Forests**, v.19, n.3, p.291-306, 2000.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. p. 61-69.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; HAUSMAN, J. F. Indissociable chief factors in the inductive phase of adventitious rooting. In A. Altman and Y. Waisel, **Biology of Root Formation and Development**. Plenum Press, New York, 1997, p. 55-63.

GEROMEL, C.; MAZZAFERA, P.; MARRACCINI, P. R.; FERREIRA, L. P.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, L. F. P. Açúcares solúveis, sacarose sintetase e sacarose fosfato sintetase durante o desenvolvimento do fruto de café, sob diferentes condições de luz e carga. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, Londrina. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2005.

GHOLZ, H. L.; CROPPER JR, W.P. Carbohydrate dynamics in mature *Pinus elliottii* var. *elliottii* trees. **Canadian Journal of Forest Research**, v.21, p.1741-1747, 1991.

GOLLE, D. P., RITTER, L. R. S. R. A., & BEVILACQUAII, C. C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, 2009.

GOMES, R. T. **Efeito do espaçamento no crescimento e nas relações hídricas de *Eucalyptus* spp. na região de cerrado de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, 85 p., 1994.

GONÇALVES, J. L. M.; VALERI, S. V. Eucalipto e pinus. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. da; RAIJ, B. van; ABREU, C.A. (Ed.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq: FAPESP: POTAFOS, p. 393-423, 2001.

GONZÁLES, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium***. Tese de doutorado, USP, Piracicaba - SP, 2002.

GOULART, I. C. G. R.; MARTINS, G.; SANTAROSA, E.; PENTEADO, J. F.; DERETI, R. M.; IEDE, E. T. **Diagnóstico preliminar das demandas por tecnologias florestais em cooperativas agropecuárias do estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2012. 37 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 234).

GRACE, J. C.; JARVIS, P. G.; NORMAN, J. M. Modelling the interception of solar radiant energy in intensively managed forests. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v.17, p.193-209, 1987.

GRAÇA, M.E.C.; CARPANEZZI, A.A.; TAVARES, F.R.; COOPER, M.A. **Estaquia de erva-mate**. Circular técnico 18, Embrapa, Colombo - PR – 1988.

GRAÇA, M. E. C.; SHIMIZU, J. Y.; TAVARES, F. R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo – PR, n. 39, p.135-138, 1999.

HAAG, H.P. **Nutrição mineral do *Eucalyptus*, *Pinus*, *Araucaria* e *Gmelina* no Brasil**. Campinas: Fundação Cargil, 1983. 101p.

HACKETT, W. P. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.11-28.

HAGGQUIST, M. L.; STRID, L.; WIDELL, K. O.; LIJENBERG, C. Identification of tryptophan in leachate of oat hulls (*Avena sativa*) as a mediator of root growth regulation. **Physiologia Plantarum**, v.72, p.423-427, 1988.

HAISSIG, B. E. Influence of aryl esters of indole-3-acetic and indole-3-butyric acids on adventitious root primordium initiation and development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 47, p. 29-33, 1979.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Hartmann and Kerster's plant propagation: principles and practices**. 8. ed. Boston: Prentice Hall, 2011, 915 p.

HÉROULT, A.; LIN, Y. S.; BOURNE, A.; MEDLYN, B. E.; ELLSWORTH, D. S. Optimal stomatal conductance in relation to photosynthesis in climatically contrasting *Eucalyptus* species under drought. **Plant, Cell & Environment**, Hoboken, v. 36, n. 2, p. 262-274, 2013.

HIGA, A. R.; GARCIA, C. H.; SANTOS, E. T. Geadas, prejuízos à atividade florestal. **Silvicultura**, São Paulo, v. 15, n. 58, p. 40-43, 1994.

HIGA, R. C. V.; HIGA, A. R.; TREVISAN, R.; SOUZA, M. V. R. de. Resistência e resiliência a geadas em *Eucalyptus dunnii* Maiden plantados em Campo Tenente, PR. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 40, p. 67-76, 2000.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil**. IPEF. Circular técnica, n. 192, 2000.

HOPKINS, W. G. **Introduction to plant physiology**. 2ª ed. New York: John Wiley e Sons, 1999, 512p.

HOPPE, J. M.; GENRO, C. J. M.; VARGAS, C. O.; FLORIANO, E. P.; REIS, E. R dos; FORTES, F. de O.; MÜLLER, I.; FARIAS, J. A. de; CALEGARI, L.; DACOSTA, L. P. E. **Produção de sementes e mudas florestais**. Universidade Federal de Santa Maria, Caderno Didático n. 1, 2ª Edição, 2004.

HOWARD, B.H. Relations between shoot growth and rooting of cuttings in three contrasting species of ornamental shrub. **Journal of Horticulture Science**, Warwick, v.71, p.591-605, 1996.

IBÁ. **Relatório das Indústrias Brasileiras de Árvores, ano base 2015**. Indústria Brasileira de Árvores, São Paulo, 2015. <Disponível: http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf> Acesso em: 10/09/2016.

IRITANI, C.; SOARES, R.V.; GOMES, A.V. Aspectos morfológicos da aplicação de reguladores do crescimento nas estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. **Acta Biologica do Paraná**, Curitiba, v.15, p.21-26, 1986.

JAEGER, P.; ZIGER, M. Avaliação das propriedades mecânicas de painéis compensados de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus dunnii*/*Pinus taeda*. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 329-338, 2007.

JANICK, J. **A ciência da horticultura**. Rio de Janeiro: F. Bastos, 1966. 485 p.

JOVANOVIĆ, T.; ARNOLD, R.; BOOTH, T. Determining the climatic suitability of *Eucalyptus dunnii* for plantations in Australia, China and Central and South America. **New Forests**, v. 19, n. 3, p. 215-226, 2000.

JOVANOVIĆ, T.; BOOTH, T. **Improved species climatic profiles**: a report for the RIRDC/L&W Australia/FWPRDC/ MDBC Joint Venture Agroforestry Program. 2002. (RIRDC Publication, n. 02/095).

KELEN, M.; DEMIRALAY, E. C.; SEN, S.; OZKAN, G. Separation of Absciscic Acid, Indole-3-Acetic Acid, Gibberellic Acid in 99 R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and Rose Oil (*Rosa damascena* Mill.) by Reversed Phase Liquid Chromatography. **Turkish Journal of Chemistry**, n. 28, p. 603-610, 2004.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KERSTEN, E.; TAVARES, S. W.; NACHTIGAL, J. C. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de ramos de plantas de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.16, n.1, p.215-222, 1994.

KIBBLER, H.; JOHNSTON, M.E.; WILLIAMS, R.R. Adventitious root formation in cuttings of *Backhousia citriodora* F. Muell: 2- seasonal influences of temperature rainfall, flowering and auxins on the stock plant. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.102, n. 3, p.343- 358, 2004.

KRATZ, D.; WENDLING, I.; PIRES, P. P. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* em substratos a base de casca de arroz carbonizada. **Scientia Forestalis**, v. 40, n. 96, p. 547-556, Piracicaba – SP, 2012.

KRUEGER, K.; TRAPPE, J.M. Food reserves and seasonal growth of Douglas-fir seedlings. **Forest Science**, v.13, p.192-202, 1967.

LANA, R. M. Q.; LANA, A. M. Q.; BARREIRA, S.; MORAIS, T. R.; FARIA, M. V de. Doses of indolbutyric acid in the rooting and growth of Eucalypt cuttings (*Eucalyptus urophylla*). **Bioscience Journal**, v.24, n.3, p.13-18, 2008.

LEANDRO, R. C.; YUYAMA, K. Enraizamento de estacas de castanha-de-cutia com uso de ácido indolbutírico. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 4, p. 421-430, 2008.

LIMA, D.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; BONA, C.3; MAYER, J.L.S. Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indol butírico relacionada aos aspectos anatômicos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n.4, p.422-438, 2011.

MARTINS, A. B. G. **Enraizamento de estacas enfolhadas de três variedades de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.)**. 1998. 100f. Tese (Doutorado em Agronomia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

MARTINS, G.; GOULART, I. C. G. R.; MAFIOLETTI, R.; SANTAROSA, E. A produção florestal e as cooperativas agropecuárias no estado do Paraná. **Paraná Cooperativo: técnico e científico**, v. 4, p. 47-60, 2012.

MOE, R.; ANDERSEN, A. S. Stock plant environment and subsequent adventitious rooting. In: DAVIES, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1988, p. 214- 234.

MORAES, C. B.; DE PIERI, C.; FRAGOSO, A. M.; GRANDE, J.; UESUGI, G.; MARTINS, M. R. S. G.; CARIGNATO, A.; RODRIGUES, D. P.; ZIMBACK, L.; MOREIRA, R. M.; MORI, E. S. **Genetic variability in *Eucalyptus* clones for rust *Puccinia psidii* resistance**. In: IUFRO WORKING GROUP 2.08.03 IMPROVEMENT AND OF CULTURE *EUCALYPTUS*, Porto Seguro: IUFRO, 2011.

MORAES, C. E.; FONSECA, R. C. de M.; RUI, M. Influência das folhas no enraizamento de miniestacas de híbridos de eucalipto. **Nucleus**, v. 11, n. 1, 2014.

MOTTA, E. P. **Técnicas de Jardinagem**: Uma parceria com a Natureza. 1ª Edição, Huaíba: Livraria Editora Agropecuária, p. 56-58, 1995.

MUNÓZ, H. I.; VALENZUELA, B. J. Enraizamento de estacas herbáceas de três cultivares de videira: efecto de la umbicación en el sarmiento y época de recolección. **Agricultura Técnica**, v.38, n.1, p.14-17, 1978.

MURAYAMA, S. J. **Fruticultura**. Cmapinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 1973, 428p.

NEGISHI, N.; NAKAHAMA, K.; URATA, N.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; KAWAOKA, A. Hormone level analysis on adventitious root formation in *Eucalyptus globulus*. **New Forests**, v. 45, p. 577–587, 2014.

NEVES, T. S.; CARPANEZZI, A. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; MARENCO, R. A. **Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília - DF, v. 41, n. 12, p. 1699-1705, 2006.

NEWELL, E. A.; MULKEY, S.S.; WRIGHT, S.J. Seasonal patterns of carbohydrates storage in four tropical trees species. **Oecologia**, v.131, p.333-342, 2002.

NIETO, V. M.; RODRIGUEZ, J. *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. In: VOZZO, J. A. **Tropical tree seed manual**. Santafé de Bogotá: Corporacion Nacional de Investigacion of Forestal, 2003. p. 466-467.

NORBERTO, P. M. **Efeitos da época de poda, cianamida hidrogenada, irrigação e ácido indolbutírico na colheita antecipada e enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.).** Lavras, 1999. 89p. Dissertação (Mestrado.) - Universidade Federal de Lavras.

OLIVEIRA, M. C. de; RIBEIRO, J. F.; RIOS, M. N. da S.; REZENDE, M. E. **Enraizamento de estacas para produção de mudas de espécies nativas de matas de galeria.** Recomendação Técnica n. 41, Embrapa, Brasília - DF - 2001.

OLIVEIRA, L. de S.; XAVIER, A. DIAS, P. C.; CORREIA, A. C. G.; BORGES, S. R.; TAKAHASHI, E. K.; PAIVA, H. N. de. Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba – SP, v. 40, n. 96, p. 507-516, 2012.

OLIVEIRA, L. A.; BRETON, M. C.; BASTOLLA, F. M.; CAMARGO, S. da S.; MARGIS, R.; FRAZZON, J. PASQUALI, G. Reference genes for the normalization of genes expression in *Eucalyptus* species. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 405-422, 2012.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; PINHO, S. Z. de. Interações entre auxinas e ácido bórico, no enraizamento de estacas caulinares de *Coffea arabica* L. CV. Mundo novo. **Scientia Agricola**, Piracicaba – SP, v. 49, n. 1, p. 23-27, 1992.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos de fisiologia do enraizamento de estacas caulinares.** Jabotical: Funep, 1996. 83 p.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; PINHO, S. Z. de. Efeito de auxinas e boro no enraizamento de estacas caulinares de kiwi retiradas em diferentes épocas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 33, n. 2, p. 213-219, 1998.

OSTERC, G.; STEFANCIC, M.; STAMPAR, F. Juvenile stockplant material enhances root development through higher endogenous auxin level. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 899–903, 2009.

OSTERC, G.; STAMPAR, F. Differences in endo/exogenous auxin profile in cuttings of different physiological ages. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 2088–2092, 2011.

PACHECO, A. C.; CASTRO, P. R. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Aspectos anatômicos do enraizamento da videira muscadínia (*Vitis rotundifolia* Michx.) através de alporquia. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 2, Piracicaba, 1998.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Imprensa Universitária, Minas Gerais, 40 p., 1993.

PALUDZYSZYN E.; RODRIGUES, A.; CORDEIRO, D. **Estratégia para o melhoramento de eucaliptos tropicais na Embrapa**. Paraná, 2004.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T dos; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. Embrapa Florestas, Colombo – PR, Documento 129, 2006.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; **Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas**. Documentos 214, Embrapa Florestas, Colombo-PR, 1ª Edição, versão eletrônica, 2011. <Disponível: <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/seriedoc/edicoes/doc124.pdf>> Acesso em 17/10/2016.

PEREIRA, J.C.D.; STURION, J.A.; HIGA, A.R.; HIGA, R.C.V.; SHIMIZU, J.Y. **Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil**. Embrapa Florestas, Colombo – PR, Documento 38, 113p. 2000.

PIO, R.; BASTOS, D. C.; BERTI, A. J.; SCARPARE FILHO, J. A.; MOURÃO FILHO, F. de A. A.; ENTELMANN, F. A.; ALVES, A. S. R.; BETTIOL NETO, J. E. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 562-567, 2005

POGGIANI, F.; SUITER FILHO, W. **Importância da nebulização intermitente e efeito do tratamento hormonal na formação de raízes em estacas de eucalipto**. In: I Congresso Brasileiro de Florestas Tropicais, Viçosa – MG. IPEF, n. 9, p. 119-129, 1974.

QADDOURY, A.; AMSSA, M. Effect of exogenous indole butyric acid on root formation and peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activities and phenolic contents in date Palm offshoots. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p. 127-131, Marrakech, Marrocos, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002, 906p.

REIS, G. G. dos; REIS, M. das G. F. **Fisiologia da brotação de eucalipto com ênfase nas suas relações hídricas**. Série Técnica IPEF, v. 11, n. 30, p. 9-22, 1997.

REIS, G. G. dos; REIS, M. das G. F.; FONTAN, I. da C. I.; MONTE, M. A.; GOMES, A. N.; OLIVEIRA, C. H. R. de. Crescimento de raízes e da parte aérea de clones de

híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e de *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus* spp. submetidos a dois regimes de irrigação no campo. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 30, n. 6, p. 921-931, 2006.

RIBAS, K. C. **Interação entre auxinas e co-fatores do enraizamento na promoção do sistema radicular em estacas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden**. Botucatu, 1997, 150 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Botânica). Universidade Estadual Paulista.

RIBEIRO, I. G. **Estabelecimento de cultura de calos visando à análise Fitoquímica e à avaliação do potencial antioxidante de *Hovenia dulcis* Thunb. cultivada in vivo e in vitro**. Dissertação (Mestrado em Biologia), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 104p., 2009.

ROCHA, M. P. da; TRUGILHO, P. F. Qualidade de madeira serrada de *Eucalyptus dunnii* em função do método de desdobro e condição de umidade. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 4, p. 314-321, 2006.

ROWE, D.B.; BLAZICH, F.A.; RAPER, C.D. Nitrogen nutrition of hedged stock plants of loblolly pine: 1- tissue nitrogen concentrations and carbohydrate status. **New Forests**, Amsterdam, v.24, p.39-51, 2002.

SANTAROSA, E.; PENTEADO JUNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G. dos R. **Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda**. Brasília – DF, Embrapa, 138p., 2014.

SANTOS, A. F. do; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2001. 20 p. (Circular Técnica, 45).

SANTOS, A. P. dos; XAVIER, A.; OLIVEIRA, M. L. de; REIS, G. G. do. Effect of the cutting, minicutting, microcutting and micropropagation techniques in the silvicultural performance of *Eucalyptus grandis* clones. **Scientia Forestals**, n. 68, p. 29-38, 2005.

SCHNEIDER, E.A.; WIGHTMAN, F. Metabolism of auxin in higher plants. **Annals of Development of Plant Physiology**, v. 25, p. 487-513, 1974.

SERRA, C.; ANTUNES, R.; HEGEWALD, H.; COSTA, C.; PINTO, A. P.; PEIXE, A. Quantificação dos níveis endógenos de auxinas e da atividade enzimática das polifenoloxidasas em oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista de Ciências Agrárias**, p. 491-499, Évora – Portugal, 2007.

SHINGH, M. Effect of zinc, phosphorous and nitrogen on tryptophan concentration in rice grains grown on limed and unlimed soils. **Plant and Soil**, v. 62, p. 305-308, 1981.

SILVA, O. R. **Enraizamento de estacas de *Eucalyptus grandis* via sistema hidropônico**. Viçosa, 1998. 142p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, J., C. O Eucalipto e suas origens. **Revista da Madeira**, Ed.59º, 2001.

SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; ALCANTARA, G. B.; SANTOS, M.; QUOIRIN, M. Tolerância ao resfriamento e congelamento de folhas de eucalipto. **Biociências**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 86-90, 2009.

SILVA, M. P. S.; BARROSO, D. G.; SOUZA, J. S.; FERREIRA, D. A.; CARNEIRO, J. G. A. Enraizamento de miniestacas e produtividade de minicepas de cedro australiano manejadas em canaletões e tubetes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 4, p. 703-713, 2012.

SILVEIRA, R. B., **Análise da rentabilidade potencial de investimentos em reflorestamento de eucalipto no leste de Mato Grosso do Sul e Norte do Paraná**. 2008. 41f. Dissertação (Mestrado em Produção e Gestão Industrial). Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo Grande, 2008.

SKOOG, F. **Plant growth substances**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT GROWTH SUBSTANCES, 10, 1980, 527p.

SOL & SOLO. **Enraizamento de estacas e micropropagação de eucaliptos**. Acesita Energética. Campinas, n. 15, nov. 1987.

STAPE, J. L.; GOMES, A. N.; ASSIS, T. F. **Estimativa da produtividade de povoamentos monoclonais de *Eucalyptus grandis* x *urophylla* no Nordeste do Estado da Bahia-Brasil em função das variabilidades pluviométrica e edáfica**. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1997. v. 3, p. 192-198.

SUNG, S. S.; XU, D. P.; BLACK, C. C. Identification of actively filling sucrose sinks. **Plant Physiology**, n. 89, 1989.

TAGLIANI, M. C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; LAVIOLA, B. G.; WENDLING, I. **Uso de ácido indol butírico na miniestaquia de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. IN: CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOENERGIA, Curitiba – PR, 2010. Disponível em:

http://www.gepe.ufpr.br/pdfs/uso_de_acido_indol_butirico_na_miniestaquia_de_pinhao_mansao.pdf Acesso em: 12/11/2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p., 2013.

TIBBITS, W. N.; HODGE, G. R. Genetic parameters for cold hardiness in *Eucalyptus nitens* (Deane & Maiden) Maiden. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 52, n. 3/4, p. 89-97, 2003.

TORRES, A. G. M. **Relação entre sazonalidade, desrama e carboidratos no crescimento do eucalipto na propagação vegetativa por miniestaquia**. 2003, 79f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais e Manejo de Florestas de Produção), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

TSIPOURIDIS, C.; THOMIDIS, T.; BLADENOPOULOU, S. Rhizogenesis of GF677, Early Crest, May Crest and Arm King stem cuttings during the year in relation to carbohydrate and natural hormone content. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 200–204, 2006.

VALLE, C. F.; CALDEIRA, C. J. Fatores que afetam o enraizamento de estacas de *Eucalyptus* spp. **Boletim Informativo IPEF**, v.6, n.18, p.107-117, jul.1978.

VÁLIO, I. F. M. Auxinas. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. 8ª Ed. Piracicaba: EPU/EDUSP, 1988, p. 39-73.

VEIERSKOV, B. Relations between carbohydrates and adventitious root formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Oregon: Dioscorides Press, v. 2, p. 70-76, 1988.

YOSHIKAWA, M.; GEMMA, H.; SOBAJIMA, Y. Rooting cofactor activity of plant phytoalexins. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 82, p. 864-866, 1986.

WALKER, A. J.; HO, L. C.; BAKER, D. A. **Carbon translocation in tomato: pathway to carbon metabolism and the rate of translocation**. Ann. Bot. n. 42, 1978.

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia**. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, 70 p., 1999.

WENDLING, I. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, v.24, n.1, p.181-186, 2000.

WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J.M.; PIRES, I.E.; ANDRADE, H.B. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia **Revista Árvore**, v.24, n.2, p.181-186, abr./jun.2000.

WENDLING, I. **Rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia seriada e micropropagação**. Viçosa, 2002, 105 p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal). Universidade Federal de Viçosa.

WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil**. Embrapa Florestas, 2003. <Disponível: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104714/1/PropagacaoVegetativa.pdf>> Acesso em: 26/09/2016.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 921-930, Viçosa – MG, 2005.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 289-292, 2007.

WENDLING, I.; BROOKS, P. R.; TRUEMAN, S. J. Topophysics in *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* seedlings: adventitious rooting capacity, stem anatomy, and Auxin and abscisic acid concentrations. **New Forests**, v. 46, p. 107-120, 2015.

WENT, F., THIMMAN, K. **The chemical nature of the root-forming hormone**. Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Series C Biological and Medical Sciences, v. 37, p. 456-459, 1934.

WILCKEN, C. F.; LIMA, A. C. V.; DIAS, T. K. R.; MASSON, M. V.; POGETTO, M. H. F. A. D. **Guia Prático de Manejo de Plantação de Eucalipto**. Unesp – Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 25 p., 2008.

XAVIER, A.; ANDRADE, H.B.; OLIVEIRA, M.L.; WENDLING, I. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de híbrido de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.25, n.4, p.403-411, 2001.

XAVIER, A. **Silvicultura Clonal I: princípios e técnicas de propagação vegetativa**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 64p. (Caderno Didático, 92).

XAVIER, A.; SANTOS, G. A. dos; OLIVEIRA, M. L. de. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 351-356, 2003.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 272 p., 2009.

ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RODRIGUES, J. D. **Estaquia: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos**. Curitiba: [K. C. Zuffellato-Ribas], 2001, 39p.

ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RODRIGUES, J. D. Relações entre épocas do ano e diferentes concentrações de ácido indol butírico no enraizamento de estacas de *Eucalyptus grandis*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 42, p. 71-80, Colombo – PR, 2001.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Análise de variância para porcentagem de miniestacas de *Eucalyptus camaldulensis* enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas (MM), permanência do par de folhas (PF), miniestacas brotadas (MB) e miniestacas enraizadas e com calos (MEC), coletadas no outono e primavera de 2015, verão e inverno de 2016, Embrapa Florestas, Colombo – PR.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO								
		ME (%)	NR (1)	CM (cm)	MC (%)	MV (%)	MM (%)	PF (%)	MB (%)	MEC (%)
Tratamentos	3	130,78*	60,07**	91,59**	568,22 ^{ns}	5,72 ^{ns}	5,72 ^{ns}	322,35 ^{ns}	493,21**	6962,37**
Erro	12	30,49	2,45	2,71	486,74	3,64	3,64	107,81	29,79	34,13
Total	15									
Coeficiente de variação (%)		5,91	21,35	20,06	213,94	203,67	203,67	11,63	6,38	8,82

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$)

Apêndice 2 – Análise de variância para os teores de proteínas totais (PT), açúcares totais (AT) e ácido indol acético (IAA) em miniestacas de *Eucalyptus camaldulensis*, coletadas no outono e primavera de 2015, verão e inverno de 2016, Embrapa Florestas, Colombo – PR.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO		
		PT (g/100)	AT ($\mu\text{g/g}$)	IAA (ng/g)
Tratamentos	3	8,66**	281176,51**	55110,44 ^{ns}
Erro	8	0,23	2389,00	35124,10
Total	11			
Teste de Bartlett (X^2)		6,88**	18,39*	3,42**
Coeficiente de variação (%)		12,20	20,69	56,60

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$)

Apêndice 3 – Análise de variância para porcentagem de miniestacas de *Eucalyptus urograndis* enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas (MM), permanência do par de folhas (PF), miniestacas brotadas (MB) e miniestacas enraizadas e com calos (MEC), coletadas no outono e primavera de 2015, verão e inverno de 2016, Embrapa Florestas, Colombo – PR.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO								
		ME (%)	NR (1)	CM (cm)	MC (%)	MV (%)	MM (%)	PF (%)	MB (%)	MEC (%)
Tratamentos	3	4487,82**	0,17 ^{ns}	117,41**	1068,58**	1213,77**	115,28*	4768,22**	137,66 ^{ns}	947,38 ^{ns}
Erro	12	36,22	0,35	3,07	25,82	24,24	29,73	108,85	152,72	409,65
Total	15									
Coeficiente de variação (%)		8,16	23,74	21,18	47,83	45,90	119,00	14,71	14,89	86,36

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$)

Apêndice 4 – Análise de variância para os teores de proteínas totais (PT), açúcares totais (AT) e ácido indol acético (IAA) em miniestacas de *Eucalyptus urograndis*, coletadas no outono e primavera de 2015, verão e inverno de 2016, Embrapa Florestas, Colombo – PR.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO		
		PT (g/100)	AT ($\mu\text{g/g}$)	IAA (ng/g)
Tratamentos	3	12,46**	259642,10**	19926,32**
Erro	8	0,08	6675,27	1071,30
Total	11			
Coeficiente de variação (%)		5,14	31,54	18,64

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$)

Apêndice 5 – Análise de variância para porcentagem de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni* enraizadas (ME), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento médio das três maiores raízes por miniestaca (CM), miniestacas com calos (MC), miniestacas vivas (MV), miniestacas mortas (MM), permanência do par de folhas (PF), miniestacas brotadas (MB) e miniestacas enraizadas e com calos (MEC), coletadas no outono e primavera de 2015, Embrapa Florestas, Colombo – PR.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO								
		ME (%)	NR (1)	CM (cm)	MC (%)	MV (%)	MM (%)	PF (%)	MB (%)	MEC (%)
Tratamentos	1	734,40*	0,47 ^{ns}	6,12*	78,25 ^{ns}	0,00**	333,72 ^{ns}	355,51 ^{ns}	1511,95*	642,25**
Erro	6	102,32	0,25	0,73	71,63	108,31	308,70	262,05	128,24	27,18
Total	7									
Coeficiente de variação (%)		31,53	21,38	77,81	46,70	104,10	44,16	51,12	43,15	42,42

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$)

Apêndice 6 – Análise de variância para os teores de proteínas totais (PT), açúcares totais (AT) e ácido indol acético (IAA) em miniestacas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni*, coletadas no outono e primavera de 2015, Embrapa Florestas, Colombo – PR.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	
		PT (g/100)	IAA (ng/g)
Tratamentos	1	57,47**	432,56 ^{ns}
Erro	4	0,04	16206,65
Total	5		
Teste de Bartlett (X^2)		13,85*	1,88**
Coeficiente de variação (%)		2,61	54,20

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

^{ns} Não significativo ($p \geq 0,05$)